
Aus der Klinik für Neurologie mit Poliklinik
am Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH – Standort Marburg
Direktor: Univ.-Professor Dr. Dr. h. c. Wolfgang Herrmann Oertel
Arbeitsgruppe Klinische Neuroimmunologie
Leiter: PD Dr. Björn Tackenberg

**EINFLUSS DER IMMUNSUPPRESSIVEN THERAPIE AUF REIFUNGSSTADIEN
UND TCR-V β -GEBRAUCH BEI DER AUTOIMMUNEN FRÜHMYASTHENIE**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt
von Christian Eienbröcker
aus Münster (Westf.)



Marburg an der Lahn 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität

Marburg am: 15.04.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: PD Dr. B. Tackenberg

1. Korreferent: PD Dr. M. Huber

INHALTSVERZEICHNIS

1.1 ZUSAMMENFASSUNG	5
1.2 SUMMARY	7
2. EINLEITUNG.....	9
2.1 Myasthenia gravis	9
2.1.1 Epidemiologie und Pathogenese	9
2.1.2 Therapie	12
2.2 Thymus	13
2.2.1 Entwicklungsgeschichte und Anatomie	13
2.2.2 Physiologie	14
2.2.2.1 Zelloberflächenmoleküle	14
2.2.2.2 Thymozytenreifung	16
2.2.2.3 Zentrale Toleranz, positive und negative Selektion	17
2.2.2.4 TCR-Degeneration und periphere Toleranz	18
2.3 Ableitung der Fragestellung	18
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Studienaufbau	20
3.2 Patienten und Probanden.....	20
3.3 Gewinnung und Aufbereitung von Blut und Thymusgewebe	21
3.3.1 Verwendete Materialien und Geräte	21
3.3.2 Herstellung des humanen Thymusmediums	21
3.3.3 Gewinnung und Verarbeitung des Thymusgewebes.....	21
3.3.4 Blutentnahme und Kryoasservation	22
3.4 Zellfärbung	22
3.4.1 Antikörper.....	22
3.4.2 Prinzip der immunhistochemischen Färbung	22
3.4.3 Färbevorgang.....	23
3.5 Durchflusszytometrische Untersuchung.....	23
3.5.1 Durchflusszytometrie	23
3.5.2 Darstellung und Auswertung der Messergebnisse.....	25
3.5.3 Auswertungsstrategien	26
3.6 Statistik.....	26
4. ERGEBNISSE.....	27
4.1 Klinische Charakteristika	27
4.2 TCR-V β -Ketten Gebrauch	28
4.3 Reifungsstadien.....	33
5. DISKUSSION.....	36
5.1 Diskussion des Versuchsansatzes und der Methoden.....	36
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	40
5.3 Ausblick.....	54
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	57

7. LITERATURVERZEICHNIS.....	61
8. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	79
9. DANKSAGUNG.....	80
10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	81
11. LEBENSLAUF	82
12. ANHANG.....	83
12.1 Listen der Studienteilnehmer.....	83
12.1.1 MG-Patienten.....	83
12.1.2 Kontrollpersonen.....	85
12.2 Verwendete Materialien und Geräte.....	86
12.3 Liste der verwendeten Antikörper.....	87
12.4 Färbungen Blut.....	88
12.5 Färbungen Thymus	89
12.5.1 CD1a und V β -Ketten.....	89
12.5.2 CD69 und V β -Ketten.....	90
12.5.3 Subpopulationen	90
12.6 Vβ-Ketten-Expansionen	91

1.1 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von TCR-V β -Gebrauch und Thymozyten-Reifungsstadien bei Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie. Auf diese Weise soll nach Hinweisen dafür gesucht werden, ob bei der autoimmunen Frühmyasthenie Mechanismen der zentralen oder der peripheren Toleranz gestört sind. In der Literatur finden sich sowohl Hinweise für intrathymische Veränderungen als auch Belege für peripher-regulatorische Störungen, die an der Pathogenese der Frühmyasthenie beteiligt sind. Damit die für die MG pathognomonischen nAChR-Autoantikörper von Plasmazellen gebildet werden können, müssen zuvor B-Zellen (die sich dann zu Plasmazellen differenzieren) durch aktivierte und klonal expandierte T-Zellen stimuliert werden. Dabei ist bislang nicht geklärt, in welchem Kompartiment die Expansion dieser T-Zellen stattfindet.

Thymus- und Blutproben von 40 Patienten mit nAChR-Ak-positiver, generalisierter oder okulärer „early-onset“ Myasthenia gravis und von 22 immunologisch gesunden Kontrollpersonen, bei denen ein kardiochirurgischer Eingriff durchgeführt werden musste, wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden V β -Expansionen im Thymus und im Blut sowie T-Zell-Reifungsstadien im Thymus bestimmt. Damit der pathophysiologische Einfluss einer immunsuppressiven Medikation untersucht werden konnte, wurde die Gruppe der Myasthenie-Patienten unterteilt in eine Untergruppe derjenigen, welche zum Zeitpunkt der Thymektomie noch nicht immunsuppressiv behandelt worden waren, und diejenigen, die zu diesem Zeitpunkt bereits mit Kortikosteroiden oder Azathioprin behandelt worden waren.

Bei der V β -Ketten-Analyse zeigten sich im Thymus keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von V β -Ketten-Expansionen zwischen den drei verschiedenen Studiengruppen. Im Blut fanden sich signifikant mehr Expansionen auf CD4⁺-einfachpositiven Lymphozyten in beiden Myasthenie-Gruppen gegenüber den Normalkontrollen. Beim Vergleich der beiden Myasthenie-Gruppen untereinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der V β -Expansionen auf CD4⁺-einfachpositiven Lymphozyten. Bei den CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der V β -Expansionen zwischen den drei Studiengruppen nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass im Blut von Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie eine signifikant höhere Anzahl von V β -Expansionen auf CD4⁺-einfachpositiven

Lymphozyten im Vergleich zu Normalkontrollen nachgewiesen werden kann und im Thymus dahingegen keine signifikanten entsprechenden Unterschiede nachweisbar sind, spricht für eine Störung der peripheren Toleranz. Da sich die Anzahl der V β -Expansionen auf CD4⁺-einfachpositiven Lymphozyten im Blut von immunsuppressiv behandelten Patienten nicht signifikant von derjenigen bei immunsuppressiv-naiven Patienten unterscheidet, scheint die immunsuppressive Medikation keinen Einfluss auf diese Störung der peripheren Selbsttoleranz zu haben.

Die Analyse der Thymozyten-Reifungsstadien zeigt ein häufigeres Vorkommen der spät-doppeltpositiven Reifungsstadien bei unbehandelten Myasthenikern im Vergleich zu Normalkontrollen ($1,38 \pm 0,71\%$ vs. $1,06 \pm 1,24\%$, $p < 0,0447$). Die früh-CD4⁺-einfachpositiven Reifungsstadien kommen bei unbehandelten Myasthenikern ebenso signifikant häufiger vor als bei den Normalkontrollen ($3,49 \pm 1,49\%$ vs. $2,21 \pm 2,08\%$, $p < 0,0413$). Beim Vergleich der beiden Myasthenie-Untergruppen untereinander zeigte sich ein selteneres Vorkommen der genannten Reifungsstadien bei den immunsuppressiv behandelten Myasthenie-Patienten im Vergleich zu den immunsuppressiv-naiven (spät-doppeltpositive: $0,74 \pm 0,64\%$ vs. $1,38 \pm 0,71\%$, $p < 0,0024$; früh-CD4⁺-einfachpositive: $2,51 \pm 2,24\%$ vs. $3,49 \pm 1,49\%$, $p < 0,0313$).

Da in genau jenen Reifungsstadien die negative Selektion autoreaktiver Thymozyten stattfindet, spricht dieser Befund für eine Störung der zentralen Toleranz bei autoimmuner Frühmyasthenie und einen die negative Selektion begünstigenden Effekt der immunsuppressiven Therapie.

Die vorliegende Arbeit spricht also für eine Störung der zentralen Selbsttoleranz bei der autoimmunen Frühmyasthenie mit nachfolgender Expansion von CD4⁺-einfachpositiven T-Zellen. Diese Expansionen scheinen sich erst nach der Emigration aus dem Thymus in die Peripherie zu ereignen (Störung der peripheren Toleranz).

Somit kommen sowohl Therapieversuche zur Stärkung der peripheren Toleranz, also zur Förderung eines peripher-regulatorischen Milieus, als auch zur Stärkung der zentralen Toleranz (z. B. Wirkstoffe, die mit intrazellulären Signalwegen von Thymozyten oder Mechanismen der Antigenpräsentation interferieren) bei der autoimmunen Frühmyasthenie in Betracht.

1.2 SUMMARY

The aim of this work is the investigation of TCR V β usage and thymocyte maturation stages in patients with autoimmune “early-onset” myasthenia gravis (MG). Thus, it shall be looked for evidence, whether mechanisms of central or peripheral tolerance are disturbed in autoimmune “early-onset” myasthenia gravis. In the literature there are clues for intrathymic changes as well as peripheral regulatory dysfunctions, which are involved in the pathogenesis of autoimmune “early-onset” myasthenia gravis. In order that the pathognomonic nAChR antibodies can be generated by plasma cells, B cells (which then differentiate to plasma cells) must be stimulated by activated and clonal expanded T cells.

Thymus and blood lymphocytes from 40 patients with nAChR antibody positive, “early-onset” myasthenia gravis and 22 immunological healthy probands, who had to undergo cardiac surgery, were examined by fluorescence activated cell sorting (FACS). TCR V β expansions in the blood and in the thymus were investigated as well as thymocyte maturation stages. In order to examine the pathophysiological influence of immunosuppressive medication the group of MG patients was divided into two subgroups: the ones who had not been treated immunosuppressively at the time of thymectomy on the one hand and those who had taken corticosteroids or azathioprine at that time on the other hand.

V β chain analysis showed no significant differences in the thymus concerning the number of V β chain expansions when the three study subgroups have been compared with each other. In the blood a significant higher number of V β expansions was found on CD4⁺ positive lymphocytes in both the immunosuppressive treated and the immunosuppressive naïve MG subgroups when compared with the normal controls. Comparing the two MG subgroups with each other showed no significant differences with regard to the number of V β expansions on CD4⁺ positive lymphocytes. Concerning CD8⁺ lymphocytes no significant differences have been found between the three study groups.

The fact that a significant higher number of V β expansions was found on CD4⁺ positive lymphocytes of MG patients when compared with normal controls and that no such differences could be detected in the thymus argues for a disturbance of peripheral tolerance in patients with autoimmune “early-onset” myasthenia gravis.

Immunosuppressive medication seems to have no influence on this disturbance of peripheral tolerance, because the number of V β expansions on CD4⁺ positive lymphocytes did not differ significantly between the immunosuppressive treated and the immunosuppressive naïve MG subgroup.

Investigation of thymocyte maturation stages showed an increased appearance of the late double positive stage in immunosuppressive naïve MG patients when compared with normal controls ($1.38 \pm 0.71\%$ vs. $1.06 \pm 1.24\%$, $p < 0.0447$). The early CD4⁺ single positive stage also occurs more frequently in immunosuppressive naïve MG patients when compared with normal controls ($3.49 \pm 1.49\%$ vs. $2.21 \pm 2.08\%$, $p < 0.0413$). Comparing the two MG subgroups with each other showed a decreased appearance of the mentioned stages in the immunosuppressively treated MG subgroup (late double positive: $0.74 \pm 0.64\%$ vs. $1.38 \pm 0.71\%$, $p < 0.0024$; early CD4⁺ single positive: $2.51 \pm 2.24\%$ vs. $3.49 \pm 1.49\%$, $p < 0.0313$).

Because negative selection of autoreactive thymocytes exactly takes place in these stages there is evidence for a disturbance of central tolerance in autoimmune “early-onset” myasthenia gravis and an influence of corticosteroids or azathioprine that supports negative selection in the thymus.

Thus, this work argues for a disturbance of the central tolerance in patients with autoimmune “early-onset” MG with succeeded expansion of CD4⁺ positive lymphocytes. These expansions seem to take place after the lymphocytes have emigrated from the thymus (disturbance of the peripheral tolerance).

Hence, therapeutic attempts for encouraging both the peripheral (i. e. facilitation of a peripheral regulatory milieu) and the central tolerance (e. g. agents which interfere with thymocyte intracellular signaling or mechanisms of antigen presentation) come into consideration in patients with autoimmune “early-onset” myasthenia gravis.

2. EINLEITUNG

2.1 Myasthenia gravis

2.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Myasthenia gravis (MG) führt zu belastungsabhängiger Muskelschwäche mit Erholung in Ruhe (Drachman 1994). Weltweit beträgt die Prävalenz etwa 78:100.000, die jährliche Inzidenz liegt bei 0,25-2,0 pro 100.000 Einwohner (Wiendl et al. 2012).

Die Erkrankung weist typische Charakteristika einer antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankung auf (Drachman 1994, Vincent 2002): (1) So lassen sich bei etwa 85-90% aller Patienten mit generalisierter MG Autoantikörper gegen den nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) an der neuromuskulären Synapse nachweisen (Lindstrom et al. 1976, Lefvert et al. 1978, Tindall 1981, Limburg et al. 1983, Vincent et Newsom-Davis 1985). (2) Die Autoantikörper binden an das Zielantigen. So fanden Engel et al. aus IgG und C3 bestehende Immunkomplexe und Fragmente degenerierter postsynaptischer Muskelmembran an der neuromuskulären Synapse von MG-Patienten (Engel et al. 1977). (3) Passiver Transfer der antigenspezifischen Antikörper führt im Tiermodell zu analoger Symptomatik (Toyka et al. 1975). (4) Durch aktive Immunisierung mit dem spezifischen Antigen lässt sich ein Tiermodell der Erkrankung produzieren (Patrick et Lindstrom 1973, Lennon et al. 1975, Lennon et al. 1991). (5) Eine Reduktion der Anzahl zirkulierender Antikörper durch Plasmapherese führt zu rascher Besserung der Symptome (Dau 1981, Antozzi et al. 1991).

Bei den für die MG pathognomonischen nAChR-Autoantikörper handelt es sich um hochaffine Ak vom Typ IgG, für deren Synthese aktivierte $CD4^{+}$ -T-Zellen (TC) mit B-Zellen (BC) interagieren müssen (Conti-Fine et al. 2006). Niedrigaffine nAChR-Ak kommen häufig vor und führen in der Regel nicht zu einem myasthenen Syndrom. So binden beispielsweise etwa 10% aller IgG-Moleküle bei Patienten mit Multiplem Myelom den nAChR, ohne dass sich dabei myasthene Syndrome in nennenswerter Anzahl finden würden (Eng et al. 1987). Bei MG-Patienten können nAChR-spezifische $CD4^{+}$ -TC mit Helferfunktion sowohl im Blut als auch im Thymus nachgewiesen werden (Hohlfeld et al. 1984), und Behandlung mit anti- $CD4$ -Ak führt zu klinischer Besserung (Ahlberg et al. 1994). Ein MG-Patient, der an AIDS erkrankte und bei dem es zu einer Depletion der $CD4^{+}$ -TC kam, zeigte eine Besserung seiner myasthenen Symptome (Nath et al. 1990). Auch tierexperimentelle Daten belegen, dass $CD4^{+}$ -TC bei der Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen. Transferiert man Lymphozyten

aus dem Blut (PBL) von MG-Patienten in Mäuse mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID), so produzieren diese Mäuse nAChR-Ak und entwickeln myasthene Symptome nur dann, wenn die transferierten PBL auch CD4⁺-TC enthielten (Wang et al. 1999). Darüber hinaus kann in Mäusen, die aufgrund eines genetischen Defektes eine Störung der CD4⁺-TC-Funktion aufweisen, keine EAMG induziert werden (Kaul et al. 1994).

Neben den Autoantikörpern gegen nAChR können bei der MG teilweise auch Ak gegen Muskel-spezifische Tyrosin-Kinase (MUSK) (Hoch et al. 2001), low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) (Higuchi et al. 2011), Titin (Aarli et al. 1990), Ryanodin-Rezeptor (Mygland et al. 1992), IFN- α und IL-12 (Meager et al. 1997) sowie transient receptor potential canonical type-3 receptor (TRPC3-Rezeptor) (Takamori 2008) nachgewiesen werden.

Nach epidemiologischen, histopathologischen und laborchemischen Gesichtspunkten werden die generalisierte MG mit frühem Beginn (early-onset myasthenia gravis, EOMG), die generalisierte MG spätem Beginn (late-onset myasthenia gravis, LOMG), die rein okuläre MG (ocular myasthenia gravis, OMG), die thymomassoziierte MG (thymoma associated myasthenia gravis, TAMG), die MUSK-Antikörper-assoziierte MG (MAMG) sowie die seronegative MG (SNMG) unterschieden (Sommer et al. 2008) (Tab. 2.1).

Bei der EOMG finden sich in mehr als 80% der Fälle Thymus-Veränderungen (Leite et al. 2007). Klassischerweise handelt es sich um eine lympho-follikuläre Hyperplasie (LFH) (Compston et al. 1980, Vincent 1994), die durch Lymphozyten-Infiltrate und Keimzentren charakterisiert wird (Meriggioli et Sanders 2009). Auch bei der OMG sind LFH gefunden worden (Schumm et al. 1985). Bei der LOMG findet man typischerweise eine Thymusinvolution und -atrophie (Ströbel et al. 2008), wohingegen die TAMG thymom-assoziiert ist. In Thymomen von Patienten, die an TAMG erkrankt sind, wurden zahlreiche autoreaktive TC nachgewiesen (Kadota et al. 2000).

	Early-onset MG	Late-onset MG	Thymom-assoziierte MG	anti-MuSK-Ak⁺ MG	Okuläre MG	Seronegative MG
	EOMG	LOMG	TAMG	MAMG	OMG	SNMG
Geschätzte Häufigkeit	20%	45%	10%	6%	15%	4%
Verlauf und Manifestation	generalisiert; Krankheitsmax. in den ersten 3 Jahren	wie EOMG	generalisiert; seltener komplette Remission zu erzielen	generalisiert, faziopharyngealer Schwerpunkt	okulär	generalisiert
Alter bei Beginn	≤ 45 Jahre	> 45 Jahre	jedes Lebensalter; zumeist 40-60	jedes Lebensalter; eher jüngere Patienten	jedes Lebensalter	jedes Lebensalter
M:F	1:3	5:1	1:1	1:3	1:2	n. a.
HLA-Assoziation (Kaukasier)	B8 A1 DR3 (stark) DR16 DR9 (weniger stark)	B7 DR2 (weniger stark) anti-Titin-Ak ⁻ mit DR7 anti-Titin-Ak ⁺ mit DR3	DR7 (stark) A25 (weniger stark)	DR14 (stark)	n. a.	n. a.
(Auto-)Antikörper	anti-AChR-Ak	anti-AChR-Ak, anti-Titin-Ak, anti-RyR-Ak	anti-AChR-Ak, anti-Titin-Ak, anti-RyR-Ak, anti-TRPC3-Ak, anti-IL12-Ak, anti-IFN α -Ak, anti-IFN γ -Ak	anti-MuSK-Ak	anti-AChR-Ak (50-70%)	keine
Typische Thymuspathologie	lymphofollikuläre Hyperplasie (LFH)	Atrophie, Involution	Thymom <ul style="list-style-type: none"> • Typ A 5% • Typ AB, B1-3 92% 	normal; allenfalls sehr wenige und kleine Keimzentren	keine systematischen Daten	verdickte TC Zonen, keine klassische LFH
Ansprechen auf Thymektomie	gut, sofern in den ersten Monaten nach Diagnosestellung	keine systematischen Daten	oftmals unzureichend	Nein	keine systematischen Daten	keine systematischen Daten
Ansprechen auf Immuntherapie	+++	+++	+(+)	+(+)	+++	+(+)

Tab. 2.1 Einteilung der MG nach epidemiologischen, histopathologischen und laborchemischen Kriterien (nach Sommer et al., 2008)

2.1.2 Therapie

Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen auch umfasst die Therapie der MG die Behandlung akuter Verschlechterungen, eine dauerhafte Immuntherapie und symptomatische Behandlungsmaßnahmen (Skeie et al. 2010).

Bei akuten Verschlechterungen im Sinne einer myasthenen Krise (lebensbedrohliche Exazerbation der MG mit respiratorischer Insuffizienz und Aspiration) werden hochdosierte Glukokortikoide mit anschließendem Ausschleichen auf eine möglichst niedrige Erhaltungsdosis (Bromberg et Carter 2004, Jani-Acsadi et Lisak 2007) und intravenöse Immunglobuline (IVIg), Plasmapherese (PS) (Skeie et al. 2010) oder Immunadsorption (IA) (Gold et al. 2008) empfohlen. Dabei gibt es keine Evidenz für die Überlegenheit von PS oder IA gegenüber IVIg und umgekehrt (Gajdos et al. 1997, Hart et al. 2007).

Im Rahmen der dauerhaften Immuntherapie kommen Glukokortikoide (Pascuzzi et al. 1984, Sghirlanzoni et al. 1984, Cosi et al. 1991, Evoli et al. 1992) und Azathioprin zur Einsparung von Cortikosteroiden (Witte et al. 1984, Mantegazza et al. 1988) zum Einsatz. Sollte sich unter Azathioprin kein ausreichender Therapieeffekt einstellen, oder im Falle nicht tolerabler Nebenwirkungen können Ciclosporin (Tindall et al. 1987, Tindall et al. 1993), Methotrexat (Heckmann et al. 2011), Mycophenolat Mofetil (Chaudhry et al. 2001, Ciafaloni et al. 2001), Tacrolimus (Ponseti et al. 2008), Rituximab (Nowak et al. 2011, Blum et al. 2011), Etanercept (Rowin et al. 2004) oder (in schweren Fällen) Cyclophosphamid (Perez et al. 1981, De Feo et al. 2002, Drachman et al. 2003) erwogen werden.

Insbesondere Patienten mit EOMG profitieren von einer Thymektomie, wobei der Effekt besonders günstig zu sein scheint, wenn die Operation innerhalb von einem Jahr nach Diagnosestellung erfolgt (Newsom-Davis 2003). Bei SNMG- und MAMG-Patienten scheint die Thymektomie keinen therapeutischen Nutzen zu haben (Wiendl et al. 2012). Diese Empfehlungen stützen sich auf retrospektive, unkontrollierte Studien. Einige Experten ziehen auch bei OMG im Falle eines ungenügenden Ansprechens auf die medikamentöse Therapie eine Thymektomie in Betracht (Schumm et Stohr 1984, Roberts et al. 2001). Patienten, bei denen eine thymomverdächtige Struktur in der Computertomographie des Thorax entdeckt wurde, sollten wegen der Gefahr eines malignen Wachstums in jedem Fall operiert werden (Wiendl et al. 2012).

Die Behandlung mit Cholinesterasehemmern stellt die wichtigste symptomatische Behandlungsmaßnahme bei MG dar (Skeie et al. 2010, Mehndiratta et al. 2011).

2.2 Thymus

2.2.1 Entwicklungsgeschichte und Anatomie

Der Thymus ist das primäre lymphatische Organ der T-Lymphozyten. Er befindet sich im Mediastinum hinter dem Sternum und über dem Herzen. Er entsteht aus dem ventralen entodermalen Epithel der paarig angelegten dritten Schlundtaschen. Durch von der Oberfläche einwachsende Bindegewebssepten entsteht der Eindruck einer Läppchengliederung (Welsch 2006). Es wird das aus dem Ektoderm stammende Cortexepithel vom zentral gelegenen Medullaepithel unterschieden (Abb. 2.1).

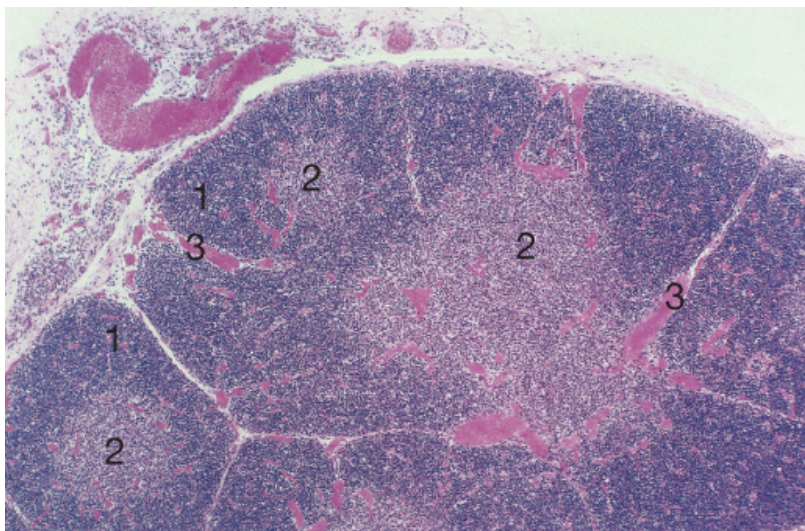


Abb. 2.1 Kindlicher Thymus mit Gliederung in Rinde (1) und Mark (2). Eine Läppchenarchitektur erhält der Thymus durch Bindegewebssepten mit Blutgefäßen (3). Färbung H.E., Vergr. 45fach (aus Welsch 2006).

Beide werden zum epithelialen Raum in Abgrenzung zum perivaskulären Raum zusammengefasst (Flores et al. 1999). Mesenchymzellen aus der Neuralleiste und dem Mesoderm sowie Thymozyten, Makrophagen und Vorläufer von dendritischen Zellen aus der fetalen Leber und dann aus dem Knochenmark wandern in die Organanlage ein (Anderson et al 1996, Trigueros et al. 1998). Während im äußeren Cortex große Mengen unreifer $CD4^-/CD8^-$ -doppelnegativer zu finden sind, so sind im inneren Cortex überwiegend Makrophagen, dendritische Zellen und reifere $CD4^+/CD8^+$ -doppeltpositive TC nachweisbar. In der Medulla findet man hauptsächlich $CD4^-$ - bzw. $CD8^+$ -einfachpositive Thymozyten, Makrophagen, medulläre Epithelzellen und dendritische Zellen (Anderson et al. 1996). Der perivaskuläre Raum enthält periphere lymphatische

Zellen und Adipozyten. Thymozyten sind hingegen nicht nachweisbar (Flores et al. 1999).

2.2.2 Physiologie

Im Thymus reifen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu immunkompetenten T-Zellen. Dabei werden verschiedene Reifungsstadien durchlaufen. Die einzelnen Reifungsstadien werden durch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit verschiedener Oberflächenmerkmale charakterisiert (Vanhecke et al. 1995). Dabei überleben nur solche Thymozyten, die in der Lage sind, mit Peptid-MHC-Komplexen zu interagieren (positive Selektion). Ist die Affinität der Bindung des T-Zell-Rezeptors an Selbst-Peptid:MHC-Komplexe zu hoch, so werden die Thymozyten apoptotisch (negative Selektion) (Hogquist et al. 2005).

2.2.2.1 Zelloberflächenmoleküle

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) dient der Erkennung von Antigenen, die mittels MHC-Molekülen präsentiert werden. Er besteht aus einer α - und einer β -Kette. Beide weisen jeweils einen konstanten und einen variablen Anteil auf. Der für die Antigenerkennung entscheidende variable Anteil der α -Kette entsteht durch zufällige Rekombination von V- und J-Gensegmenten. Bei der β -Kette werden V-, D- und J-Gensegmenten nach dem Zufallsprinzip kombiniert (Bassing et al. 2002). Dieser Mechanismus führt zu mindestens 10^8 verschiedenen Lymphozytenspezifitäten, die in einem Menschen vorhanden sind (TCR-Repertoire) (Murphy et al. 2009). Durch zusätzliche Insertion und Deletion entstehen drei hypervariable Bereiche, die sogenannten complementary determining regions (CDR). Der variable Anteil der β -Kette ($V\beta$ -Kette) kann durchflusszytometrisch erfasst werden. So kann in Thymus- und Blutproben derjenige Anteil von Lymphozyten bestimmt werden, der eine bestimmte $V\beta$ -Kette aufweist. Die Oberflächenmerkmale CD4 und CD8 fungieren als Co-Rezeptoren bei der TCR-Peptid-MHC-Interaktion. Über die intrazellulären Domänen dieser beiden Moleküle werden nach Bindung des MHC-präsentierten Antigens zytoplasmatische Signaltransduktionen in Gang gesetzt, die die Empfindlichkeit des TCR für das Antigen erhöhen (Davis et al. 1990).

Der TCR erkennt Peptide nur dann, wenn sie innerhalb einer anderen Zelle aus Proteinen erzeugt und dann von speziellen Molekülen, sogenannten Major-Histocompatibility-Complex(MHC)-Molekülen, präsentiert werden. Dabei werden das MHC-I-Molekül und das MHC-II-Molekül unterschieden. Fast alle kernhaltigen Zellen

exprimieren MHC I und benutzen es, um Peptide an $CD8^+$ -Lymphozyten zu präsentieren. MHC II werden in der Regel auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten präsentiert. Der MHC-II-Antigen-Komplex wird dann von $CD4^+$ -Lymphozyten erkannt. MHC-Moleküle sind hochpolymorph (Murphy et al. 2009).

Das CD69-Gen codiert für ein Lektin, das der Rezeptorfamilie der natürlichen Killerzellen zugerechnet wird. Es wird auf hämatopoetischen und lymphatischen Zellen exprimiert, sobald diese aktiviert werden (Marzio et al. 1999, Sancho et al. 2005). Während der Thymozytenreifung wird CD69 von unreifen $CD4^+/CD8^+$ -doppeltpositiven Thymozyten exprimiert und erst im reifen $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -einfachpositiven Reifungsstadium wieder herunterreguliert, wenn die Zellen den Thymus verlassen. CD69 scheint die vorzeitige Emigration von Thymozyten zu verhindern und führt zu einer Akkumulation $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -einfachpositiver Zellen in der Medulla (Marzio et al. 1999, Feng et al. 2002). So konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass CD69 an den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 (S1P1) auf T-Lymphozyten binden kann, was zu einer Herunterregulierung dieses Rezeptors führt (Shiow et al. 2006). Da S1P1 für die Emigration von Lymphozyten aus dem Thymus und sekundären lymphatischen Organen benötigt wird (Matloubian et al. 2003), führt die Bindung von CD69 an S1P1 somit zu einer Lymphozyten-Retention in lymphatischen Organen.

CD27 ist ein Glykoprotein, das zur TNF-Rezeptor-Familie gehört und das auf den meisten $CD8^+$ -positiven PBL, auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie auf Subpopulationen von Memory-B-Zellen exprimiert wird (van Lier et al. 1987, Maurer et al. 1990, Dürkop et al. 1997). Es bindet an CD70 auf dendritischen Zellen und B-Lymphozyten (Hintzen et al. 1994). Diese Interaktion führt zu einem Signal, welches costimulatorisch auf T-Zellen wirkt, die neu aktiviert wurden (Murphy et al. 2009). Dies wiederum führt zu T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion (Arens et al. 2001, van Oosterwijk et al. 2007).

CD45 ist ein Glykoprotein, das auf Lymphozyten exprimiert wird. Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Isoformen. Naïve T-Lymphozyten exprimieren die CD45RA-Isoform. Nachdem sie aktiviert wurden, verlieren sie diese Unterform und exprimieren stattdessen die CD45RO-Isoform (Henson et al. 2012). T-Zellen können

jedoch auch von der CD45RO- zur CD45RA-Isoform re-konvertieren (Michie et al. 1992, Callan et al. 1998, Wills et al. 1999).

CD1a ist ein Glykoprotein und gehört zur Gruppe der CD1-Moleküle, die von antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden und (ähnlich den MHC-Molekülen) sowohl endogene als auch exogene Lipide an T-Zellen präsentieren. Die T-Zellen werden so zu Proliferation und Differenzierung angeregt (Silk et al. 2008, Cohen et al. 2009). Während der Thymozytenreifung wird CD1a früh auf der Zelloberfläche exprimiert und ist erst auf reifen Thymozyten der Medulla nicht mehr nachweisbar (Vanhecke et al. 1995, Sommer et al. 2008).

2.2.2.2 Thymozytenreifung

Die aus dem Knochenmark in den Thymus einwandernden Vorläuferzellen sind zunächst CD4⁻/CD8⁻-doppelnegativ und interagieren mit dem Mesenchym und der extrazellulären Matrix des äußersten Thymuscortex (Anderson et al. 1996, Res et Spits 1999). Sie beginnen mit der somatischen Rekombination der Gene für die β -Kette des TCR (s. o.) und exprimieren CD1a (Res et Spits 1999, Hogquist et al. 2005). Die β -Kette wird zusammen mit der Prä- α -Kette und CD3 als Prä-TCR auf der Zelloberfläche exprimiert. Nach Beendigung β -Ketten-Genumlagerung proliferieren die Zellen. Nun wird die Expression von CD4 und CD8 begonnen, und es erfolgt die Gen-Umlagerung der α -Kette. Die α -Kette wird sodann exprimiert, mit der β -Kette kombiniert und zusammen mit CD3 als TCR in die Zellmembran eingefügt. (Trigueros et al. 1998, Hogquist et al. 2005). Die Zellen werden im Thymuscortex positiv selektioniert, falls sie in der Lage sind, Antigen-MHC-Komplexe über ihren TCR zu erkennen (Anderson et al. 1999). Sie tragen die Oberflächenmoleküle CD4, CD8, CD1a, CD69 und TCR. Nach der positiven Selektion werden die Zellen im Verlauf CD27-positiv und verlieren entweder CD4 oder CD8, sodass sie entweder CD4⁺- oder CD8⁺-einfachpositiv sind. Im späten CD4⁺/CD8⁺-doppeltpositiven Stadium oder im frühen CD4⁺- bzw. CD8⁺-einfachpositiven Stadium migrieren die Zellen in die Medulla, wo die weitere Reifung, die negative Selektion oder die Prägung zur regulatorischen Zelle erfolgt (Hogquist et al. 2005). Die Zellen tragen nun CD4 oder CD8, CD1a CD69 und CD27 auf ihrer Oberfläche. Nach Herunterregulierung von CD1a proliferieren sie erneut (Res et al. 1997, Hare et al. 1998, Anderson et al. 1999), verlieren schließlich CD69 (Vanhecke et al. 1995) und verlassen den Thymus (Anderson et al. 1999). Abbildung 2.2

veranschaulicht die Expression verschiedener Oberflächenmerkmale auf Thymozyten während ihrer Reifung im Thymus.

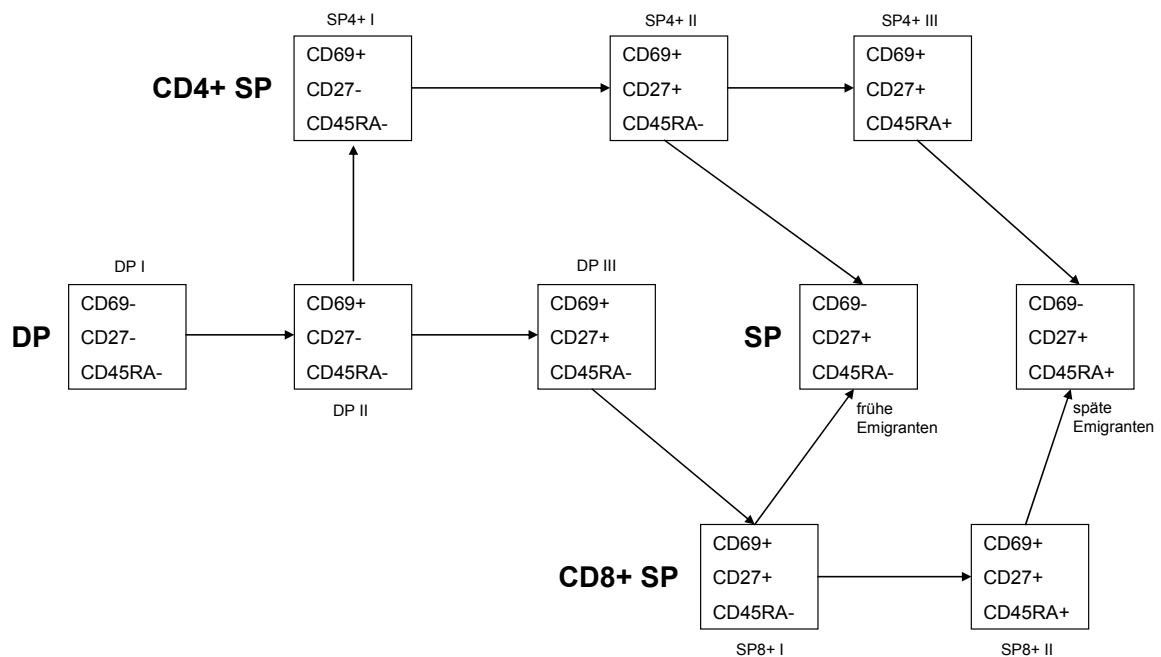


Abb. 2.2 Intrathymische Reifungsstadien von Thymozyten (nach Vanhecke et al. 1995).

2.2.2.3 Zentrale Toleranz, positive und negative Selektion

CD4⁺/CD8⁺-doppeltpositive Thymozyten können nur für drei bis vier Tage überleben und sterben den programmierten Zelltod, wenn sie nicht in eine Interaktion mit einem Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplex eintreten. Wenn die Thymozyten in der Lage sind, diese von corticalen Thymusepithelzellen präsentierten Komplexe zu erkennen, so entgehen sie der Apoptose. Dieser Vorgang wird als positive Selektion bezeichnet (Murphy et al. 2009). Ein erneuter Selektionsschritt findet im spät-CD4⁺/CD8⁺-doppeltpositiven bzw. früh-CD4⁺- bzw. früh-CD8⁺-einfachpositiven Reifungsstadium in der Medulla des Thymus statt (Hogquist et al. 2005). Hier werden den reifenden und zuvor positiv selektionierten Thymozyten von medullären Thymusepithelzellen oder dendritischen Zellen erneut Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexe präsentiert. Zeigen die Thymozyten nun eine zu stark ausgeprägte Affinität, die durch einen kräftigen vorübergehenden Ca²⁺-Einstrom und die Aktivierung des extracellular-signal-regulated-kinase(ERK)-Signalwegs charakterisiert ist (Morris et Allen 2012), so werden sie apoptotisch (negative Selektion) oder sie reifen zu einer regulatorischen Zelle (T_{reg}) (Hogquist et al. 2005). Das entscheidende Signal für die Differenzierung zur T_{reg} liefert dabei möglicherweise das von Hassall-Körperchen gebildete thymic stromal lymphopoietin (TSLP) (Liu 2009). Die negativ selektierten Thymozyten werden in die

Apoptose überführt. Dieser Mechanismus des programmierten Zelltodes für diejenigen Thymozyten, die eine zu hohe Affinität gegenüber Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexen aufweisen, wird als zentrale (Selbst-)Toleranz bezeichnet.

Durch die beiden Selektionsschritte wird gewährleistet, dass die Lymphozyten nach der Emigration in die Peripherie über TCR-MHC-Interaktion aktiviert und dann an der Immunantwort beteiligt werden können, solange ihnen fremde und nicht Selbst-Antigene präsentiert werden.

2.2.2.4 TCR-Degeneration und periphere Toleranz

Durch die oben beschriebenen somatischen Genumlagerungen und die dargestellten Selektionsmechanismen kommt es zur Bildung eines peripheren T-Zell-Pools mit etwa 10^8 verschiedenen TCR (Murphy et al. 2009). Ein TCR-Molekül kann jedoch nicht nur ein einziges, sondern wiederum etwa 10^8 verschiedene Peptide binden. Dieser Umstand wird als Degeneriertheit des TCR bezeichnet und führt einerseits zu einer hohen Spezifität der adaptiven Immunantwort, erhöht andererseits aber auch das Risiko für Autoimmunreaktionen (Hemmer et al. 1998, Hemmer et al. 2000). Solche Autoimmunreaktionen werden beim Gesunden durch Mechanismen der peripheren Toleranz verhindert.

Drei wesentliche Mechanismen tragen zur peripheren Toleranz bei: (1) Wenn eine T-Zelle mit einem Antigen interagiert, das ihr nicht von einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle präsentiert wird, und wenn sie dabei keine costimulatorischen Signale erhält so wird sie anergisch. (2) Deletion wird induziert, wenn T-Zellen übermäßig aktiviert werden. (3) Autoimmunreaktionen können durch die oben bereits erwähnten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) supprimiert werden (Romagnani 2006). T_{reg} wirken inhibierend auf Effektor-T-Zellen, hemmen antigenpräsentierende Zellen und sezernieren antiinflammatorische Zytokine (Sakaguchi 2005, Romagnani 2006, Bacchetta et al. 2007).

2.3 Ableitung der Fragestellung

Myasthenia gravis gilt als prototypische antikörper-vermittelte Autoimmunerkrankung (Cavalcante et al. 2012). Und obwohl klare Hinweise für eine pathogenetische Beteiligung des Thymus vorliegen, so sind die Mechanismen, die die Krankheit auslösen, dennoch weiterhin unklar – zumal sich auch Belege für eine Störung der

peripheren Toleranz finden lassen. Im Blut von MG-Patienten wurden TCR-abhängige Expansionen von Lymphozyten nachgewiesen (Tackenberg et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich diese Expansionen auch im Thymus nachweisen lassen. Eine große Zahl von MG-Patienten und immunologisch gesunden Kontrollpersonen wurde bezüglich sowohl des peripheren als auch des zentralen TCR-V β -Gebrauchs untersucht. Da im Falle peripherer Expansionen letztlich nicht klar beurteilt werden kann, ob die Expansionen tatsächlich peripher erfolgt sind, oder ob die Zellen intrathymisch expandiert und dann nach peripher emigriert sind, wurden darüber hinaus die intrathymischen Reifungsstadien nach Vanhecke et al. 1995 untersucht, um spezifisch-intrathymische Veränderungen aufdecken zu können. Ziel war es, weitere Hinweise darüber zu erhalten, ob bei der MG Mechanismen der zentralen oder der peripheren Toleranz gestört sind. Durch Einteilung der MG-Patienten in die Gruppen der immunsuppressiv behandelten und der immunsuppressiv-naiven Patienten sollte zusätzlich der Einfluss einer solchen Behandlung dokumentiert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studienaufbau

Über einen Zeitraum von fünfeinhalb Jahren wurden Thymus- und Blutproben von 40 Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie gewonnen. Darüber hinaus wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren und acht Monaten Thymus- und Blutproben von 22 immunologisch gesunden Kontrollpersonen (CTRL) gewonnen, bei denen aufgrund einer kardiologischen Erkrankung eine Herzoperation mit Sterniotomie durchgeführt werden musste. Die Gruppe der MG-Patienten wurde unterteilt in die Gruppe derer, welche zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv behandelt wurden (Prednison, Prednisolon, Methylprednisolon oder Azathioprin) (MG IS), und in die Gruppe derer, bei denen die Thymektomie in immunsuppressiv-naivem Zustand durchgeführt wurde (MG NT).

3.2 Patienten und Probanden

Die in diese Studie aufgenommenen MG-Patienten, bei denen als kausaler Therapieansatz die Indikation zur Thymektomie gestellt worden war, und die immunologisch gesunden Kontrollpersonen, die aufgrund einer Herzerkrankung eine kardiochirurgische Operation mit Sterniotomie benötigten, erklärten sich nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und ausreichender Bedenkzeit zur Teilnahme an der Studie bereit. Es erfolgte jeweils eine schriftliche Einverständniserklärung zur Entnahme von Blutproben und zur Hemithymektomie (Kontrollpersonen) bzw. zur Thymektomie (MG-Patienten). Die Studienteilnehmer willigten in die wissenschaftliche Untersuchung der gewonnenen Proben zu Forschungszwecken ein.

Patienten-Einschlusskriterien waren neben der schriftlichen Einverständniserklärung die Erstmanifestation der Erkrankung in einem Alter von 49 oder weniger Jahren sowie die volle Geschäftsfähigkeit. Es wurden nur solche Patienten eingeschlossen, bei denen Antikörper (Ak) gegen den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) nachgewiesen werden konnten. Ausgeschlossen von der Studie wurden solche Patienten, bei denen die histopathologische Begutachtung des gewonnenen Thymusgewebes den Nachweis eines Thymoms oder eines Thymuskarzinoms erbrachte, sowie diejenigen, bei denen in einem Zeitraum von 6 Wochen vor der Thymektomie eine klinisch apparente Infektion vorlag (Temperatur > 37,5 °C).

Die Einschlusskriterien für Probanden wurden erfüllt, wenn diese sich schriftlich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden erklärten, wenn keine Autoimmunerkrankung und keine maligne Erkrankung bekannt war, wenn keine immunsuppressive oder immunmodulierende Medikation eingenommen wurde und wenn im Zeitraum von sechs Wochen vor der Herzoperation keine klinisch apparente Infektion vorlag (Temperatur > 37,5 °C).

3.3 Gewinnung und Aufbereitung von Blut und Thymusgewebe

3.3.1 Verwendete Materialien und Geräte

Im Anhang werden unter 12.2 die für die Thymus- und Blutverarbeitung verwendeten Geräte und Materialien gezeigt.

3.3.2 Herstellung des humanen Thymusmediums

Um das Überleben der Thymozyten ex vivo zu gewährleisten, wurde ein „Thymusmedium“ hergestellt. Dabei wurden folgende Lösungen in den angegebenen Mengen zusammengegeben und steril filtriert: 500 ml RPMI 1640 Medium, 5 ml MEM Non Essential Amino Acids, 5 ml Sodium Pyruvate, 6,25 ml Hepes Buffer, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 12 ml Humanserum, 5 ml L-Glutamin, 500 µl β-Mercaptoethanol-PBS-Mischung (174 µl Mercaptoethanol in 50 ml PBS).

3.3.3 Gewinnung und Verarbeitung des Thymusgewebes

Bei den Normalkontrollen wurde nach der für den kardiochirurgischen Eingriff erforderlichen Thorakotomie und während der dann folgenden Präparation der Aorta ascendens, an die die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen wird, jeweils eine ca. 1,5 cm³ große Probe, maximal aber die Hälfte des noch vorhandenen Thymus, entnommen, nachdem zuvor eine sorgfältige Organpräparation und eine Ligatur der den Thymus versorgenden Gefäße erfolgt waren. Die Probe wurde dann steril in ein mit 20 ml RPMI gefülltes PP-test-tube gegeben und dieses wiederum 4°C auf Eis gelagert. Unter Aufrechterhaltung einer durchgehenden Kühlkette wurde die Gewebeprobe in das Zellkulturlabor der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg gebracht und dort gemäß etablierter Methoden (Tackenberg et al. 2007, Tackenberg et al. 2009, Nitschke 2009) weiterverarbeitet.

Zehn ml humanes Thymusmedium (s. o.) wurden in eine Petrischale gegeben. Anschließend wurden 200 µl DNase hinzugegeben, um einer Zellaggregation vorzubeugen. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurde die Gewebeprobe unter

sterilen Bedingungen und unter Zuhilfenahme eines Spritzenstempels durch ein Sieb in die vorbereitete Petrischale gedrückt. Nun wurde die entstandene Suspension unter Zurücklassung des flüssigen Fettes abpipettiert und in ein PP-test-tube gegeben, welches zuvor mit 20 ml humanem Thymusmedium und 200 µl DNase gefüllt worden war. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 1400 U/min und 4°C wurde der Überstand abgegossen und die Zellsuspension zur Erythrozytenlyse für drei Minuten mit 3 ml 10%iger PharM-Lyse-Aqua-ad-iniectabilia-Lösung inkubiert. Anschließend wurden 30 ml Thymusmedium hinzugegeben, und es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Nach erneutem Abgießen des Überstandes wurde wiederum mit 20 ml Thymusmedium aufgefüllt. Zur Feststellung der Zellzahl erfolgte nun eine Färbung der abgestorbenen Thymozyten durch Versetzung von 30 µl der entstandenen Zellsuspension mit 30 µl Trypanblau. Die verbleibenden vitalen Thymozyten wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Gesamtzahl wurde nach der Formel

$$\text{Zellzahl} \cdot 2 \cdot 10.000 \cdot \text{Menge an Zellsuspension in ml}$$

berechnet.

3.3.4 Blutentnahme und Kryoasservation

Jedem Patienten und jeder Kontrollperson wurden 9 ml venöses Blut entnommen. 5 ml wurden für die durchflusszytometrischen Untersuchungen benötigt, der Rest wurde ohne Zusätze für spätere Analysen bei minus 80°C eingefroren.

3.4. Zellfärbung

3.4.1 Antikörper

Im Anhang sind unter 12.3 die für die Färbung der Lymphozyten verwendeten Antikörper aufgelistet. Es wurden für die 45 verschiedenen Färbungen Mischungen aus jeweils 60 µl APC- und PerCP-markierten und 100 µl FITC- und PE-markierten Antikörpern hergestellt. Im Anhang sind unter 12.4 und 12.5 alle Färbungen verzeichnet.

3.4.2 Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung besteht darin, dass die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert werden, sofern die Zellen das Oberflächenprotein exprimieren, gegen das der Antikörper gerichtet ist.

Die Antikörper werden von Maus-Plasmazellen gebildet. Den Mäusen werden das Antigen oder antigenträgende Zellen intraperitoneal injiziert, und es erfolgt eine klonale Expansion von Plasmazellen, die die gewünschten Antikörper produzieren. Nach Hybridisierung mit Myelomzellen können große Mengen identischer und antigenspezifischer Antikörper gewonnen werden. Diese werden mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert und als gebrauchsfertige Lösungen zum Verkauf angeboten.

Die vier in dieser Studie verwendeten Farbstoffe emittieren nach Anregung durch einen Laser (s. 3.5.1) Licht unterschiedlicher Wellenlänge (s. 12.4 und 12.5, Anhang). Pro Färbung konnten also Antikörper gegen vier verschiedene Oberflächenproteine gleichzeitig verwendet und somit deren gemeinsames Vorkommen auf einer Zelle untersucht werden.

3.4.3 Färbevorgang

Es wurden jeweils 200 µl Blut bzw. Thymussuspension in 96-well-PS-Micro-Platen pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für vier Minuten bei 1200 U/min und 4°C. Nach Verwerfung der Überstände wurden in jedes well 5 µl von einer der Antikörpermischungen (s. Tabellen 12.4 und 12.5, Anhang) gegeben und für 25 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden entfernt, indem mit 200 µl 5%iger FCS-PBS-Lösung gewaschen und abzentrifugiert wurde. Es erfolgte eine Resuspension in 180 µl Cellwash® und eine Lagerung bei 4°C bis zur durchflusszytometrischen Untersuchung. Da Erythrozyten bei der FACS-Analyse stören, erfolgten bei der Blutfärbung nach der Antikörperinkubation noch zwei Erythrozytenlyseschritte. Dafür wurde jedes well für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 200 µl 10%iger PharM-Lyse-Aqua-ad-iniectabilia-Lösung inkubiert und dann abzentrifugiert. Anschließend wurde der Schritt noch einmal wiederholt.

3.5 Durchflusszytometrische Untersuchung

3.5.1 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurde das FACS-Calibur®-Gerät verwendet. Es handelt sich um ein Durchflusszytometer mit zwei Lasern (rot und blau), das für Vierfarbenanalysen geeignet ist. Ein Durchflusszytometer ist aus drei Komponenten zusammengesetzt: dem Spülsystem, der Optik und der Detektionselektronik. Das

Spülsystem dient dem Probentransport. Jeweils der Inhalt eines wells der 96-well-Platte (s. o.) wird in ein Röhrchen pipettiert und durch eine Ansaugkapillare in das Gerät aufgenommen. Das Zellsuspension-Antikörper-Gemisch wird durch eine feine Düse mit hohem Druck in den Spülstrom gedrückt, welcher in laminarer Strömung eine Küvette passiert. Dadurch entsteht eine sogenannte hydrodynamische Fokussierung, d. h. der Probenstrom wird so verengt, dass er den Durchmesser genau einer Zelle hat. So wird jede fluoreszenzmarkierte Zelle einzeln durch den Laser angeregt. Durch Reflexion und Diffraction entsteht Streulicht und durch Anregung der Farbstoffe Fluoreszenz. Ein komplexes System von Spiegeln, Filtern und Linsen ist den Lichtdetektoren vorgeschaltet (s. Abbildung 3.1). Vom Vorwärtsstreulicht (FSC), welches entlang der Laserachse gestreut wird und ein Parameter für die Zellgröße ist, wird das Seitwärtsstreulicht (SSC), welches rechtwinklig streut und ein Maß für die Zellgranularität darstellt, unterschieden. Die Intensität und Farbe des Fluoreszenzlichtes hängt von der Art und Zahl der gebundenen konjugierten Antikörper ab. Die Detektorsignale werden in digitale Signale umgewandelt, welche mit Hilfe der FacsComp®-Software verrechnet und als Punkthistogramme auf dem Bildschirm dargestellt werden (s. Abbildung 3.2).

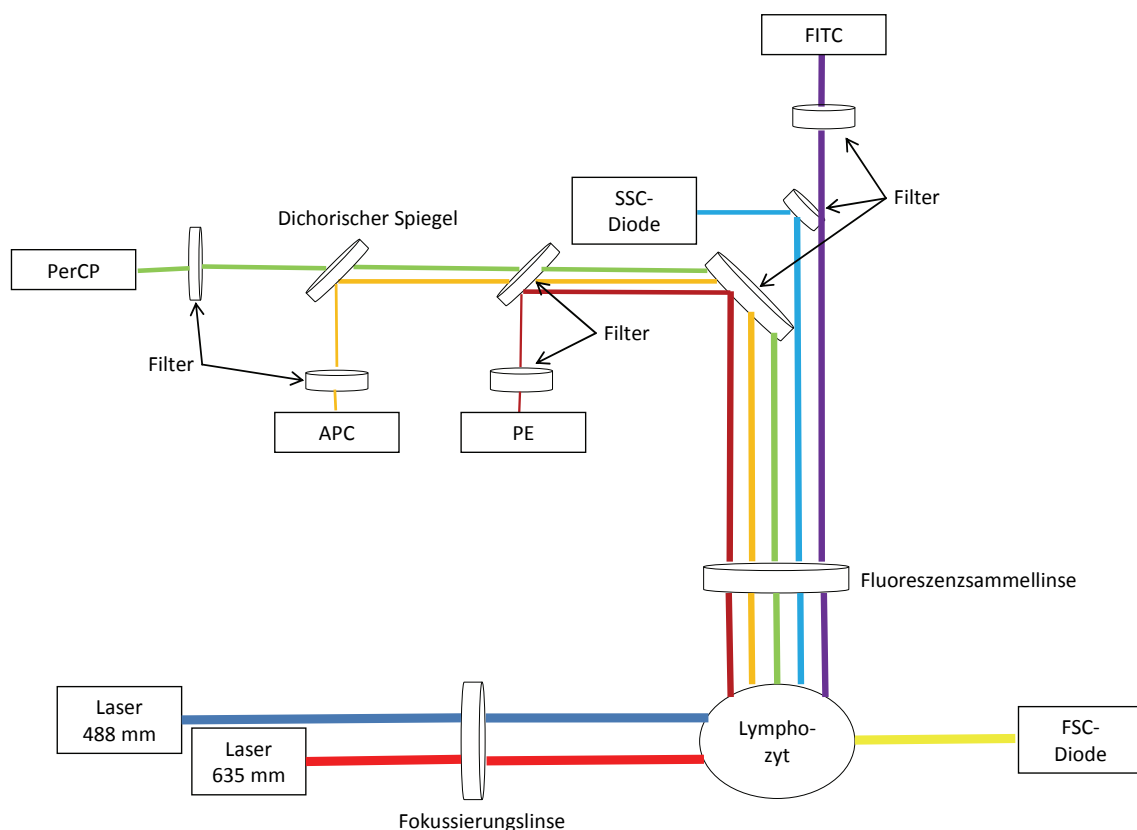


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des FACS-Calibur®-Gerätes.

3.5.2 Darstellung und Auswertung der Messergebnisse

Zunächst wurde in dem Histogramm, in dem FSC- und SSC-Werte gegeneinander aufgetragen wurden (s. Abbildung 3.2 links oben), das elektronische Messfenster (im Folgenden gate genannt) auf die Lymphozyten- bzw. Thymozytenpopulation gesetzt. Diese ließ sich durch Unterschiede in Granularität und Größe von anderen Populationen wie z. B. Granulozyten oder Zelltrümmern abgrenzen. Im zweiten Histogramm (s. Abbildung 3.2 links unten) wurden diese Lymphozyten anhand der Stärke der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 differenziert in die vier Grundpopulationen: CD4-einfachpositive, CD8-einfachpositive, CD4/CD8-doppeltpositive (nur im Thymus) und CD4/CD8-doppeltnegative Lymphozyten. Auf die drei bzw. zwei (Blut) erstgenannten Subpopulationen wurde jeweils ein gate gesetzt und in Histogrammen (s. Abbildung 3.2 rechts) die Expression der zwei weiteren Marker der jeweiligen Färbung für jede Subpopulation getrennt dargestellt. In diesen Histogrammen wurden die Messquadranten analog einer Negativkontrolle (einer Probe der gleichen Lymphozyten ohne Antikörperzugaben) adjustiert. Die prozentualen und absoluten Anteile der Zellen in den gates und Messquadranten wurden dann in Tabellen angezeigt (s. Abbildung 4.1) und konnten für die weitere Auswertung mittels Microsoft Excel 2007® und Graph Pad Prism 6 verwendet werden.

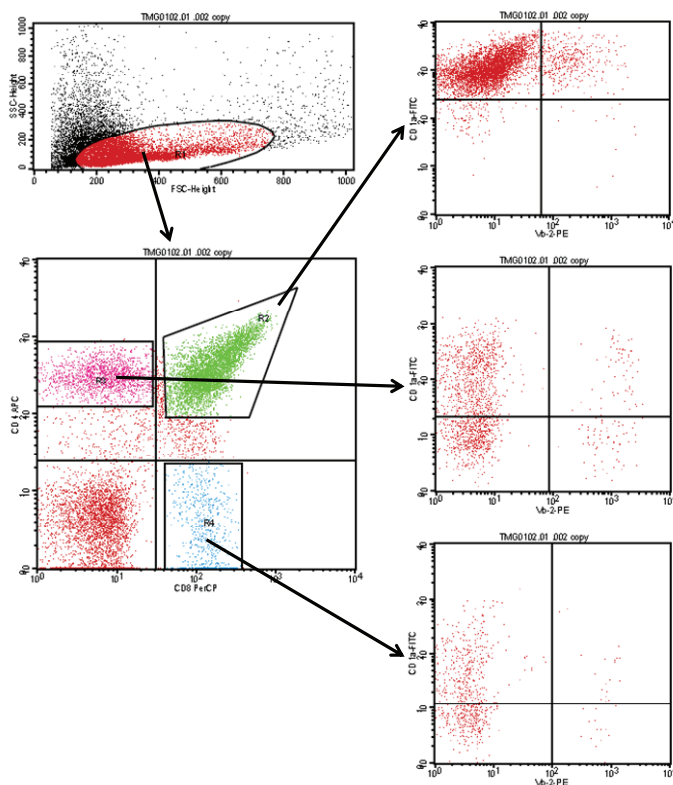


Abb. 3.2 Histogramme (s. Kap. 3.5.2)

3.5.3 Auswertungsstrategien

Die Rohdaten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2007® weiterverarbeitet. Für die Berechnung der prozentualen Anteile der TCR-V β -Ketten im Thymus wurde eine TCR- α/β -Bereinigung der Daten durchgeführt. Anhand der Ergebnisse der Färbung 22 (TCR- α/β , TCR- γ/δ , CD4 und CD8 (s. Tabelle Färbung Anhang)) wurde für jede Grundpopulation nach einer Formel (s. u.) der prozentuale Anteil einer jeden V β -Kette an allen TCR- α/β tragenden Thymozyten dieser Grundpopulation berechnet:

$$\frac{\text{Zahl der V}\beta\text{-Ketten positiven Zellen} \times 100}{\text{Zahl aller Zellen dieser Färbung} \times \text{TCR-}\alpha/\beta\text{-positive Zellen in \%}}$$

3.6 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Microsoft Excel 2007® und Graph Pad Prism 6 durchgeführt.

Die drei in dieser Studie untersuchten Gruppen (immunsuppressiv behandelte bzw. unbehandelte MG-Patienten, Normalkontrollen) wurden zunächst hinsichtlich klinischer Charakteristika miteinander verglichen (s. Tab. 4.1). Da diesbezüglich von nicht-normalverteilten Parametern ausgegangen werden muss und da es sich um nichtverbundene Stichproben handelt, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Gleiches gilt für die Mittelwerte der prozentualen Expressionen bestimmter Zelloberflächenmarker, die bei der Analyse der Reifungsstadien bestimmt wurden, sodass auch hier der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung kam. Bei der V β -Ketten-Analyse wurden multiple t-Tests für verbundene Stichproben mit Holm-Sidak-Korrektur für die statistischen Berechnungen verwendet, da es sich hier um verbundene Stichproben handelt. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf $\alpha=0,05$ festgelegt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Klinische Charakteristika

Eine Übersicht über die klinischen Charakteristika und die Thymushistologie der Studienteilnehmer zeigt Tab. 4.1. Zwei detaillierte Tabellen mit separater Auflistung der einzelnen Studienteilnehmer finden sich im Anhang (12.1).

	MG IS	MG NT	CTRL
Teilnehmeranzahl	23	17	22
Alter (Jahre)	32,3±10,1	27,5±8,7	55,2±11,7
M:F	1:2,3	1:16	6,3:1
Krankheitsdauer (Monate)	21,4±28,7	16,8±17,7	-
MGFA-Klasse	2,1±0,5	1,9±0,5	-
Weitere Autoimmunerkrankungen (Anzahl)	0,2±0,5	0,3±0,5	-
Pyridostigmin-Dosis (mg)	305,9±135,6	206,9±139,2	-
Corticosteroid-Dosis (mg)	26,5±29,8	0	-
Azathioprin-Dosis (mg)	82,6±78,1	0	-
Thymushistologie	16xLFH, 4x Normalbefund, 3x Involution	17xLFH	-

Tab. 4.1 Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer. Für das Alter, die Krankheitsdauer, die MGFA-Klasse, die Anzahl der weiteren Autoimmunerkrankungen und die Medikamentendosierungen werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. MGFA: Myasthenia Gravis Foundation of America.

Zwischen den beiden Studiengruppen der MG-Patienten bestehen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Alters ($p=0,14$), des Geschlechts ($p=0,11$), der Krankheitsdauer ($p=0,49$), der MGFA-Klasse ($p=0,19$) oder der Anzahl weiterer Autoimmunerkrankungen ($p=0,40$). Die zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv behandelten MG-Patienten erhielten jedoch signifikant höhere Pyridostigmin-Dosierungen ($p<0,0226$). Die immunologisch gesunden Kontrollpersonen waren zum Zeitpunkt der Thymektomie signifikant älter als die MG-Patienten (p jeweils $< 0,0001$). Darüber hinaus weist die Gruppe der Kontrollpersonen einen signifikant höheren Anteil des männlichen Geschlechts auf als in der Gruppe MG IS ($p<0,0002$) und in der Gruppe MG NT ($p<0,0001$).

4.2 TCR-Vβ-Ketten Gebrauch

Die Lymphozyten der Patienten und der Kontrollpersonen wurden bezüglich ihres TCR-Vβ-Ketten-Gebrauchs analysiert. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Untersuchung für Vβ 2 im Thymus von Patient TMG 01.

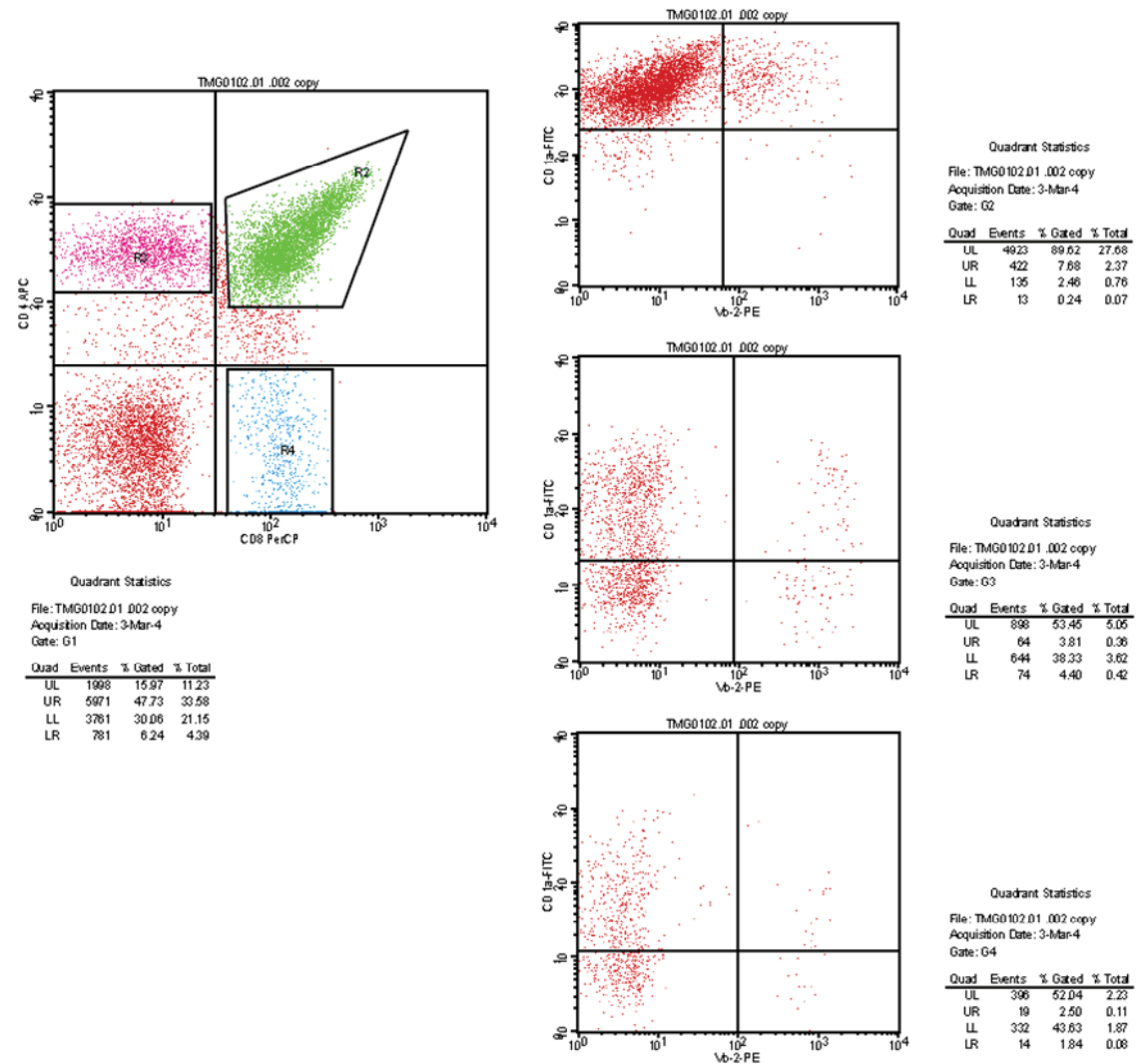


Abb. 4.1 Gezeigt sind die FACS-Daten des Thymus von Pat. TMG 01 (Vβ-Ketten-Färbung 2). Der relative Anteil der TCR-Vβ-spezifischen Thymozyten wird als prozentualer Anteil an allen CD4- und/oder CD8-positiven Thymozyten jedes Gates (R2-R4) berechnet.

Es wurden pro Thymus die prozentualen Anteile der 21 TCR-Vβ-Ketten (s. 12.3, Anhang) auf den Zellen der drei Thymusgrundpopulationen, also den unreiferen CD4⁺/CD8⁺-doppeltpositiven, den CD4⁺-einfachpositiven und den CD8⁺-einfachpositiven T-Zellen, bestimmt. In einem zweiten Schritt wurde der prozentuale Anteil jeder Kette an allen TCR-α/β-tragenden Thymozyten berechnet. Dieser Wert wurde wiederum zu dem aus der Gruppe der Normalkontrollen erhaltenen Mittelwert für die jeweilige Vβ-Kette in Relation gesetzt. Anhand der folgenden Formel wurde die

Anzahl der Standardabweichungen berechnet, um die das jeweilige Ergebnis vom Mittelwert bei den Normalkontrollen abwich:

$$E = \frac{x - \mu}{SD}$$

E: Anzahl der Standardabweichungen, um die der Wert vom Normal-Mittelwert abweicht; x: prozentualer Anteil der die jeweilige V β -Kette tragenden T-Zellen; μ : Mittelwert der jeweiligen V β -Ketten-Expression bei Normalkontrollen; SD: Standardabweichung der jeweiligen V β -Ketten-Expression bei Normalkontrollen.

Tab. 4.2 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen V β -Ketten-Expressionen im Thymus der immunologisch gesunden Kontrollpersonen.

		TCR V β Kette																				
		1.1	2.1	3.1	5.1	5.2	5.3	7	8.1	9.1	11.1	12.2	13.1	13.6	14.1	16.1	17.1	18.1	20.1	21.3	22.1	23.1
CD4⁺	MW	4,4	9,1	4,5	5,2	1,1	1,4	2,0	5,3	2,2	0,7	1,8	3,2	1,9	2,7	0,8	4,8	0,9	2,8	2,3	4,2	1,6
	SD	3,6	2,8	3,2	1,9	0,7	1,0	1,9	1,9	1,4	0,7	0,7	1,4	1,0	1,5	0,5	2,0	0,6	1,8	2,0	2,4	2,1
CD8⁺	MW	5,8	5,1	5,4	3,8	1,3	1,2	3,4	4,4	1,9	1,3	1,9	2,8	1,7	4,8	1,7	6,9	0,7	2,7	3,1	3,7	2,2
	SD	2,4	3,1	4,9	2,7	0,9	1,2	2,2	2,6	1,6	1,7	1,8	1,5	1,5	3,7	2,2	8,7	1,1	2,0	3,2	4,6	3,1
DP	MW	3,8	9,6	6,1	3,7	1,9	1,9	5,6	5,1	1,6	1,2	2,7	3,4	2,4	4,1	2,7	5,3	2,6	3,0	3,2	4,0	2,2
	SD	1,6	2,9	6,2	2,4	1,3	1,5	2,8	2,7	1,3	0,7	1,8	1,5	2,0	3,1	2,5	2,7	2,8	2,4	2,6	2,5	1,8

Tab. 4.2 Normalwerte des relativen Anteils an TCR V β -Familien von CD4⁺-, CD8⁺- und CD4⁺/CD8⁺-doppeltpositiven TC im Thymus in %.

Analog wurde bei der Analyse des V β -Ketten-Gebrauchs von Lymphozyten im Blut verfahren. Da sich im Blut jedoch keine CD4⁺/CD8⁺-doppeltpositiven Lymphozyten finden (Vanhecke et al. 1995) und nahezu alle Lymphozyten im Blut (PBL) den aus der α - und der β -Kette zusammengesetzten TCR tragen (Murphy et al. 2009), wurden lediglich die Subpopulationen der CD4⁺- und der CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten analysiert, und es brauchte keine TCR- α/β -Bereinigung durchgeführt zu werden. Anstelle der Mittelwerte der in diese Studie eingeschlossenen Kontrollpersonen wurden Werte von Normalkontrollen aus einer früheren Publikation (Tackenberg et al. 2007) verwendet, da in der letztgenannten Studie eine höhere Anzahl von Blutproben untersucht worden war (n = 118).

Tab. 4.3 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen V β -Ketten-Expressionen im Blut aus der genannten Publikation.

		TCR Vβ Kette																				
		1.1	2.1	3.1	5.1	5.2	5.3	7	8.1	9.1	11.1	12.2	13.1	13.6	14.1	16.1	17.1	18.1	20.1	21.3	22.1	23.1
CD4 ⁺	MW	3,2	9,8	4,3	6,9	1,2	1,0	1,7	4,7	5,2	0,7	1,9	3,7	2,0	2,6	1,0	5,6	1,3	2,8	3,4	4,1	0,5
	SD	0,8	1,8	2.1	1,5	1,0	0,3	0,6	1,0	2,2	0,4	0,5	0,7	0,9	0,6	0,4	1,1	0,6	1,6	1,1	1,1	0,2
CD8 ⁺	MW	4,7	6,6	4,1	2,9	0,8	1,0	3,3	3,7	2,6	0,6	1,6	3,2	1,5	5,6	1,1	5,0	0,4	1,8	2,6	3,2	1,6
	SD	2,6	3,8	3,1	1,7	0,5	0,7	2,0	2,2	2,1	0,5	1,8	1,8	1,1	3,6	0,9	2,4	0,9	1,5	1,3	2,1	1,5

Tab. 4.3 Normalwerte des relativen Anteils an TCR V β -Familien von CD4⁺- und CD8⁺-TC im Blut in %.

Abb. 4.2 zeigt exemplarisch die flusszytometrische Analyse V β -Ketten 1.1 und 2.1 der PBL von TMG 13. Es zeigt sich ein relativer Anteil der V β 1.1 exprimierenden TC von 47,8% an allen CD8⁺-Lymphozyten. Dies entspricht einer Abweichung von 16,6 Standardabweichungen vom Mittelwert der Norm.

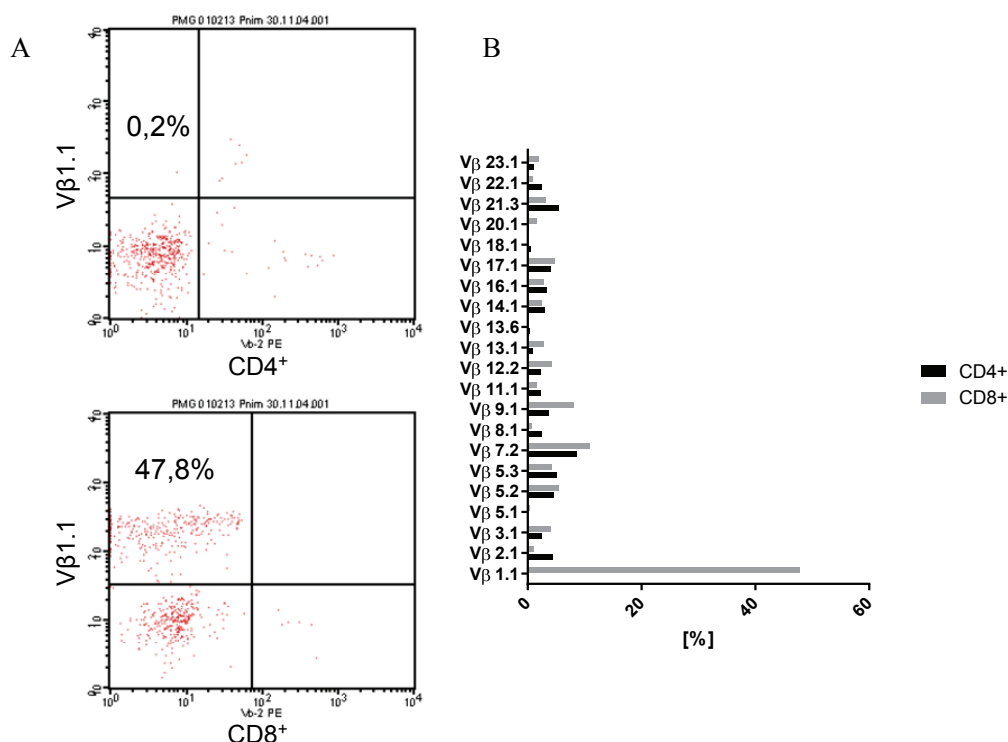


Abb. 4.2 Flusszytometrische Analyse der Expression der V β -Ketten 1.1 und 2.1 im Blut des MG-Pat. TMG 13. (A) Daten einer 40-jährigen Frau mit seropositiver OMG ohne immunsuppressive Medikation, bei der 47,8% der CD4⁺-Lymphozyten im Blut V β 1.1⁺ waren. (B) Das komplette PBL-TCR-Profil aller getesteten V β -Antikörper der gleichen Pat.

Im Anhang sind unter 12.6 die V β -Ketten-Expansionen aller Studienteilnehmer im Thymus und im Blut dargestellt. Berücksichtigt wurden jene Expansionen, die um mindestens zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Norm lagen. Fett gedruckt sind jene Expansionen, welche sich für eine bestimmte V β -Kette sowohl im Thymus als auch im Blut fanden.

Bei den immunsuppressiv vorbehandelten MG-Patienten zeigten sich drei V β -Expansionen (Ketten 7, 18 und 22) unter den CD4⁺-einfachpositiven TC und vier Expansionen (Ketten 5.2, 5.3, 7 und 13) unter den CD8⁺-einfachpositiven TC, welche sowohl im Thymus als auch im Blut nachweisbar waren. Unter den immunsuppressiv bislang nicht behandelten MG-Patienten fanden sich zwei solcher zentraler und peripherer Expansionen (Ketten 13.1 und 14) bei den CD4⁺-einfachpositiven TC, und die Anzahl dieser Expansionen bei den immunologisch gesunden Kontrollpersonen betrug 1 (V β -Kette 1 bei den CD4⁺-einfachpositiven TC) bzw. 2 (V β -Ketten 16 und 22 bei den CD8⁺-einfachpositiven TC).

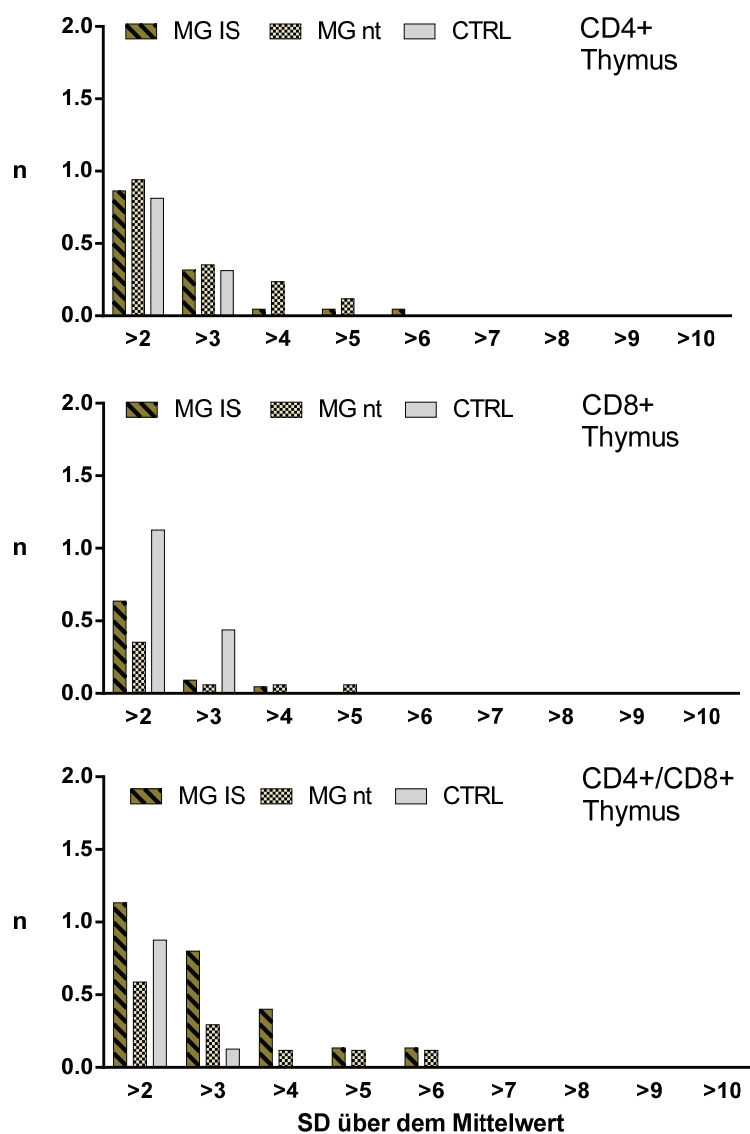


Abb. 4.3 Anzahl der V β -Expansionen pro MG-Patient bzw. Kontrollperson in Abhängigkeit von der Anzahl der Standardabweichungen über der Norm (s. Tab. 4.2 und 4.3). MG IS: MG-Pat., die zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv behandelt wurden; MG nt: zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv-naive MG-Patienten; CTRL: Normalkontrollen.

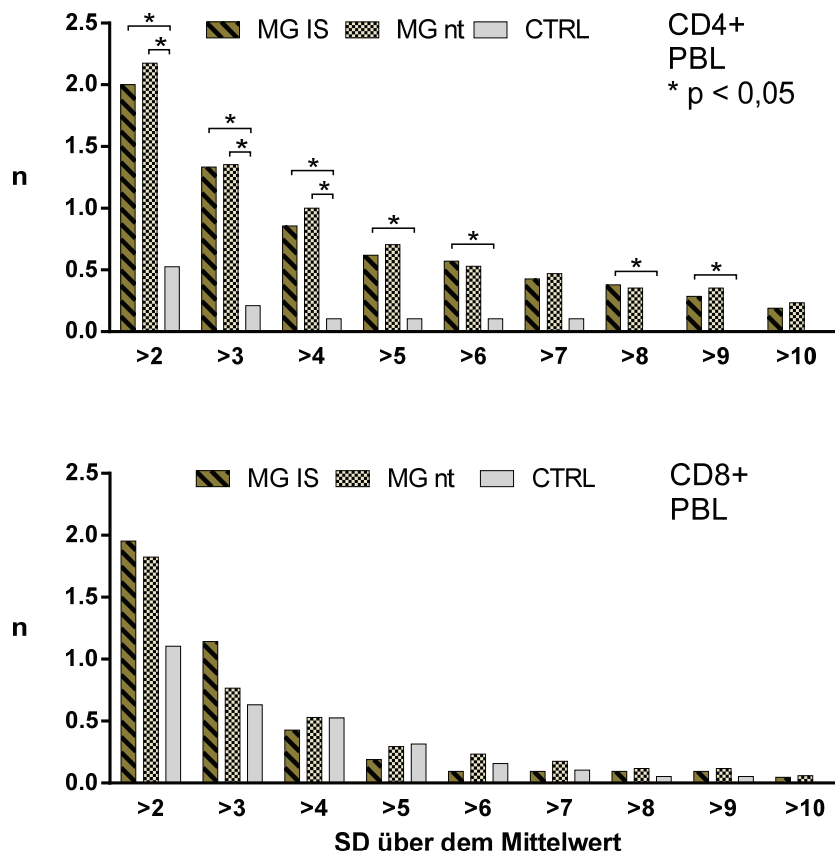


Abb. 4.4 Anzahl der V β -Expansionen pro MG-Patient bzw. Kontrollperson in Abhängigkeit von der Anzahl der Standardabweichungen über der Norm (s. Tab. 4.2 und 4.3). MG IS: MG-Pat., die zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv behandelt wurden; MG nt: zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv-naive MG-Patienten; CTRL: Normalkontrollen.

Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen die Anzahl der V β -Expansionen pro Studienteilnehmer. Dabei werden die drei verschiedenen Studiengruppen untereinander verglichen.

Im Thymus finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen hinsichtlich der Anzahl der V β -Expansionen pro Teilnehmer.

Im Blut konnte eine signifikant erhöhte Anzahl von V β -Expansionen pro Teilnehmer bei den CD4⁺-einfachpositiven TC in den Gruppen MG IS und MG NT (jeweils im Vergleich zu den Normalkontrollen) nachgewiesen werden für diejenigen Expansionen, die um mehr als zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht oder neun (MG IS) bzw. zwei, drei oder vier (MG NT) Standardabweichungen vom Mittelwert der Norm abweichen. Bei den CD8⁺-einfachpositiven Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Im Blut finden sich ebenso wie im Thymus keine signifikanten Unterschiede bezüglich der

V β -Expansionen pro Teilnehmer zwischen den immunsuppressiv behandelten und immunsuppressiv unbehandelten MG-Patienten.

4.3 Reifungsstadien

Wie im Abschnitt 3.5.2 bereits dargestellt werden im Thymus die Grundpopulationen der doppeltnegativen ($CD4^-/CD8^-$), der einfachpositiven ($CD4^+/CD8^-$ bzw. $CD4^-/CD8^+$) und der doppeltpositiven ($CD4^+/CD8^+$) Thymozyten unterschieden. Die drei letztgenannten Populationen können wiederum durch Anfärbung der Oberflächenmerkmale CD27, CD69 und CD45RA in verschiedene Stadien unterschiedlichen Reifungsgrades eingeteilt werden (Vanhecke et al. 1995, Sommer et al. 2008).

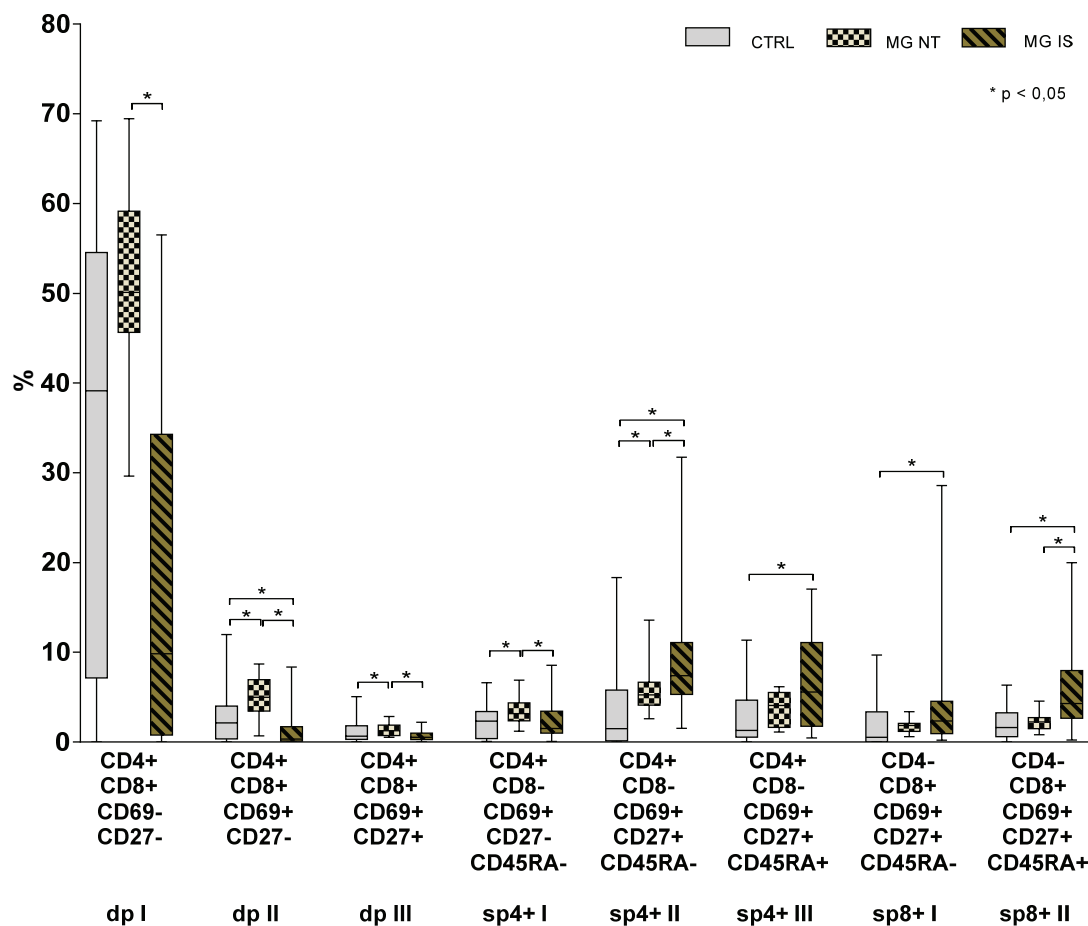


Abb. 4.5 Relativer Anteil der Reifungsstadien der doppelt- und einfachpositiven Thymozyten an allen Thymozyten. MG IS: MG-Pat., die zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv behandelt wurden; MG NT: zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv-naive MG-Patienten; CTRL: Normalkontrollen.

Dabei werden die Reifungsstadien DN ($CD4^-/CD8^-$), DP I ($CD4^+/CD8^+/CD69^-/CD27^-$), DP II ($CD4^+/CD8^+/CD69^+/CD27^-$), DP III ($CD4^+/CD8^+/CD69^+/CD27^+$), SP4 I

(CD4⁺/CD8⁻/CD69⁺/CD27⁻/CD45RA⁻), SP4 II (CD4⁺/CD8⁻/CD69⁺/CD27⁺/CD45RA⁻), SP4 III (CD4⁺/CD8⁻/CD69⁺/CD27⁺/CD45RA⁺), SP8 I (CD4⁻/CD8⁺/CD69⁺/CD27⁺/CD45RA⁻) und SP8 II (CD4⁻/CD8⁺/CD69⁺/CD27⁺/CD45RA⁺) unterschieden (s. Abschnitt 2.2.2.2 und Abb. 2.2).

In der Abbildung 4.5 werden die relativen Anteile der verschiedenen Reifungsstadien der doppelpositiven und der CD4⁺- bzw. CD8⁺-einfachpositiven an allen Thymozyten dargestellt. Dabei werden die drei Studiengruppen miteinander verglichen.

Es findet sich in der Gruppe der immunsuppressiv behandelten MG-Patienten ein signifikant geringerer Anteil aller doppelpositiven Reifungsstadien im Vergleich zur Gruppe MG NT (DP I: 18,71±19,50% vs. 51,05±10,90%, p<0,0001; DP II: 1,14±1,82% vs. 5,06±2,23%, p<0,0001; DP III: 0,74±0,64% vs. 1,38±0,71%, p<0,0024). Die Reifungsstadien DP II und DP III finden sich signifikant häufiger in der Gruppe MG NT als in der Gruppe der Normalkontrollen (DP II: 5,06±2,23% vs. 2,74±3,00%, p<0,0017; DP III: 1,38±0,71% vs. 1,06±1,24%, p<0,0447). Darüber hinaus findet sich in der Gruppe MG IS ein gegenüber den Normalkontrollen signifikant verringerter Anteil des Stadiums DP II (1,14±1,82% vs. 2,74±3,00%, p<0,0372).

Die Reifungsstadien SP4 I und SP4 II kommen in der Gruppe der MG-Patienten, die zum Zeitpunkt der Thymektomie nicht immunsuppressiv behandelt wurden, signifikant häufiger vor als in der Gruppe der Normalkontrollen (SP4 I: 3,49±1,49% vs. 2,21±2,08%, p<0,0413; SP4 II: 5,83±2,57% vs. 3,34±4,62%, p<0,0039). Bei den immunsuppressiv behandelten MG-Patienten findet sich ein signifikant häufigeres Vorkommen der Reifungsstadien SP4 II und SP4 III im Vergleich zu den Normalkontrollen (SP4 II: 8,97±6,34% vs. 3,34±4,62%, p<0,0001; SP4 III: 6,43±5,19% vs. 2,73±2,92%, p<0,0064). Der relative Anteil des Reifungsstadiums SP4 II ist in der MG IS-Gruppe signifikant höher als in der Gruppe MG NT (8,97±6,34% vs. 5,83±2,57%, p<0,0477). Ein signifikant verringertes relatives Vorkommen des Reifungsstadiums SP4 I findet man in der Gruppe der immunsuppressiv behandelten MG-Patienten gegenüber den immunsuppressiv-naiven MG-Patienten (2,51±2,24% vs. 3,49±1,49%, p<0,0313).

Die Reifungsstadien SP8 I und SP8 II kommen in der Gruppe der immunsuppressiv behandelten MG-Patienten signifikant häufiger vor als in der Gruppe der Normalkontrollen (SP8 I: 3,88±5,81% vs. 1,81±2,65%, p<0,0097; SP8 II: 5,80±4,94%

vs. $2,00 \pm 1,82\%$, $p < 0,0012$). Der relative Anteil des Reifungsstadium SP8 II ist darüber hinaus in der MG IS-Gruppe signifikant höher als in der Gruppe MG NT ($5,80 \pm 4,94\%$ vs. $2,24 \pm 0,94\%$, $p < 0,0048$).

5. DISKUSSION

5.1 Diskussion des Versuchsansatzes und der Methoden

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Thymus- und Blutproben von Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie und der Vergleich mit ebensolchen Proben immunologisch gesunder Kontrollpersonen mit der Frage, welchen Einfluss eine immunsuppressive Therapie auf Reifungsstadien von Thymozyten und auf den TCR-V β -Gebrauch von Thymozyten und PBL hat. Auf diese Weise soll nach Hinweisen dafür gesucht werden, ob bei der autoimmunen Frühmyasthenie der Thymus oder die Peripherie der Ort der primären Autoimmunreaktion ist, ob also Mechanismen der zentralen oder der peripheren Toleranz gestört sind.

Damit die für die MG pathognomonischen nAChR-Autoantikörper von Plasmazellen gebildet werden können, müssen zuvor B-Zellen (die sich dann zu Plasmazellen differenzieren) durch aktivierte CD4⁺-TC stimuliert werden (Conti-Fine et al. 2006). Es ist bislang nicht gelungen, diejenigen T-Zellen, welche an der Entstehung der MG beteiligt sind, eindeutig zu identifizieren. CD4⁺-TC-abhängige Immunantworten, die gegen den nAChR gerichtet sind, können sowohl bei MG-Patienten (Hohlfeld et al. 1984, Harcourt et al. 1988, Protti et al. 1990a, Berrih-Aknin et al. 1991, Ong et al. 1991, Sommer et al. 1991, Salvetti et al. 1991, Melms et al. 1992, Link et al. 1992, Moiola et al. 1994, Hawke et al. 1996, Nagvekar et al. 1999) als auch bei Gesunden (Sommer et al. 1991, Salvetti et al. 1991, Melms et al. 1992) nachgewiesen werden. In diesen Studien wurden jeweils zirkulierende Lymphozyten aus dem Blut von MG-Patienten oder Kontrollpersonen isoliert und in Zellkulturen durch Applikation verschiedener Epitope des humanen nAChR oder des nAChR des Zitterrochens stimuliert. Die dabei proliferierenden Zellen wurden anschließend isoliert und näher charakterisiert. Schwierigkeiten bei diesem Versuchsansatz stellten die Tendenz aktivierter T-Zell-Klone zur Apoptose (Bieganowska et al. 1997) und das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen in der Zellkultur (Protti et al. 1990b) dar.

Diese antigenabhängigen Untersuchungen erbrachten nur wenige Hinweise auf pathogenetische Mechanismen bei der MG (Tackenberg et al. 2007). Ein möglicher Grund ist die Tatsache, dass neben Auto-Ak gegen verschiedene Epitope des nAChR (Fujii et Lindstrom 1988, Link et al. 1992, Moiola et al. 1994, Hawke et al. 1996, Nagvekar et al. 1999) auch Ak gegen andere Antigene der neuromuskulären Synapse wie z. B. Muskel-spezifische Tyrosin-Kinase (MUSK) (Hoch et al. 2001), Titin (Aarli

et al. 1990), Ryanodin-Rezeptor (Mygland et al. 1992), Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 4 (LRP4) (Higuchi et al. 2011) und Interleukine wie IFN- α und IL-12 (Meager et al. 1997) nachgewiesen werden können. Insbesondere kommt es bei MG-Patienten durch sogenanntes „determinant spreading“ zu Immunantworten gegen mehrere Epitope des nAChR (Hill et al. 1999, Curnow et al. 2001, MacLennan et al. 2008). Das angesprochene „determinant spreading“ kann durch anti-cytotoxic lymphocyte-associated protein-4(CTLA4)-Ak intensiviert werden. Im Tiermodell führt dies zu gesteigerter T-Zell-Antwort und EAMG mit Nachweis von nAChR-Ak (Wang et al. 2001). Genpolymorphismen im CTLA4-Gen sind mit MG assoziiert (Wang et al. 2008). Auch die sogenannte Degeneriertheit des TCR, also die Tatsache, dass ein TCR nicht nur ein einzelnes, sondern etwa 10^8 verschiedene Antigene erkennen kann (Hemmer et al. 2000), könnte die Schwierigkeiten bei der Identifizierung der pathogenetischen CD4⁺-TC erklären. Antigenabhängige Untersuchungen bergen somit die Gefahr einer Verzerrung durch a-priori-Selektion von Zellen, die eben nur gegen bestimmte antigene Epitope gerichtet sind.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wählten Tackenberg et al. einen alternativen, antigen- und epitop-unabhängigen Ansatz zur Untersuchung von TC bei MG (Tackenberg et al. 2007), der auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde. Expandierte T-Lymphozyten wurden mittels durchflusszytometrischer Erfassung des variablen Anteils der β -Kette ihres T-Zell-Rezeptors nachgewiesen. Dabei wurden sowohl Blutproben als auch Thymussuspensionen von EOMG-Patienten und Normalkontrollen untersucht. Da im Falle des Nachweises von Expansionen im zentralen (intrathymischen) Kompartiment nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die TC peripher expandiert und dann nach intrathymisch immigriert sind, wurde darüber hinaus der Ansatz der flusszytometrischen Reifungsstadien-Analyse im Thymus gewählt, um spezifische intrathymische Veränderungen detektieren zu können.

Gegenüber dem Nachweis von Oberflächenmarkern mittels PCR bietet die Durchflusszytometrie den Vorteil, dass mehrere exprimierte Moleküle gleichzeitig nachgewiesen werden können. So können Thymozyten bei der FACS-Analyse nicht nur hinsichtlich der Grundpopulationen (CD4⁺-einfachpositive, CD8⁺-einfachpositive und CD4⁺/CD8⁺-doppeltpositive), sondern auch hinsichtlich der von Vanhecke et al. vorgeschlagenen, differenzierteren Reifungsstadien untersucht werden (Vanhecke et al. 1995). Ebenso können CD4⁺-einfachpositive, CD8⁺-einfachpositive und

(intrathymische) $CD4^+/CD8^+$ -doppeltpositive Lymphozyten getrennt hinsichtlich ihres TCR-Phänotyps untersucht werden, wohingegen bei auf PCR-Analysen basierenden Methoden lediglich die Expression verschiedener TCR-V β -Ketten in der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten ermittelt werden kann (Navaneetham et al. 1998). Zudem zeichnet sich die FACS-Analyse durch eine schnelle (und einfache) Handhabung sowie durch eine hohe Sensitivität aus (Muraro et al. 2000). Während bei der PCR die zu untersuchenden Zellen zuvor zerstört werden müssen, können bei der Flusszytometrie Oberflächenmoleküle lebender Zellen nachgewiesen werden. Nachteile der gewählten Methode sind der höhere Zellbedarf und die Tatsache, dass nicht für alle bekannten V β -Ketten fluoreszenzmarkierte Antikörper zur Verfügung stehen. Es existieren lediglich für etwa 75% der auf $CD4^+$ - und für etwa 60% der auf $CD8^+$ -TC exprimierten V β -Ketten Antikörper, die zur Markierung und anschließenden FACS-Analyse verwendet werden können. Darüber hinaus kann die Klonalität einer Expansion flusszytometrisch nicht nachgewiesen werden (Muraro et al. 2000).

Mehrere systematische Fehler könnten die Ergebnisse verfälschen. Einer Verunreinigung der Thymussuspension durch Blut wurde durch Lyse- und Waschschrte, die vor der flusszytometrischen Analyse durchgeführt wurden, vorgebeugt. Bei der Herstellung der Thymussuspension, bei der das Gewebe unter Zuhilfenahme eines Spritzenstempels durch ein Sieb gepresst wird, werden neben den zu untersuchenden TC auch Epithelzellen, Mesenchymzellen und dendritische Zellen aus dem Gewebeverband gelöst. Da diese Zellen weder $CD4$ noch $CD8$ exprimieren, finden sie sich in der Gruppe der doppeltnegativen TC. In dieser Studie wurden jedoch Reifungsstadien und der TCR-V β -Gebrauch $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -einfachpositiver sowie $CD4^+/CD8^+$ -doppeltpositiver TC untersucht. Durch ein hohes Signifikanzniveau sollte das Risiko untersucherabhängiger Fehler bei der FACS-Analyse minimiert werden.

Eine Möglichkeit der Verzerrung bei der Auswertung der Reifungsstadien bestand darin, dass bei der Ermittlung von relativen Anteilen verschiedener einzelner Stadien an der Gesamtheit aller flusszytometrisch erfassten Thymozyten ein falscher Wert bei einem einzelnen Stadium die Anteile von allen anderen Stadien ebenso verfälscht: ein zu hoch bezifferter Anteil in einem bestimmten Stadium lässt die Anteile der anderen Stadien geringer erscheinen, als sie tatsächlich sind, und falls der relative Anteil eines Stadiums fälschlicherweise zu niedrig beziffert wird, so ergeben sich automatisch falsch

hohe Werte für die anderen Stadien. Auf dieses Problem wurde auch von anderer Seite schon hingewiesen (Craston et al. 1997).

Letztlich liefern diese Ansätze jedoch nur Hinweise auf mögliche pathogenetische Aspekte bei der Entstehung der MG, ohne dass die angesprochenen CD4⁺-TC, die B-Zellen zur Bildung der nAChR-Ak befähigen, eindeutig identifiziert bzw. näher charakterisiert werden können.

Durch Einteilung der thymektomierten Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie in Gruppen der zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv behandelten und immunsuppressiv unbehandelten Patienten sollten darüber hinaus der Einfluss einer solchen Therapie dokumentiert und somit retrospektiv Hinweise auf den immunologischen Effekt bei EOMG gefunden werden.

Dabei könnte ein Bias die Studienergebnisse verfälschen, der sich aus der Heterogenität der drei Studiengruppen ergibt. Zwar fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der MGFA-Klasse zwischen den beiden Studiengruppen der MG-Patienten. Jedoch nahmen die zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv behandelten MG-Patienten neben der immunsuppressiven Medikation auch signifikant höhere Pyridostigmin-Dosen ein als die immunsuppressiv-naiven MG-Patienten. Es muss somit von einer höheren Krankheitsaktivität und somit auch von einer ausgeprägteren Autoimmunreaktion in der Gruppe MG IS ausgegangen werden. Die beiden Gruppen der MG-Patienten unterscheiden sich nicht signifikant hinsichtlich der Anzahl anderer Autoimmunerkrankungen. Dennoch kann eine Verzerrung der Ergebnisse durch autoimmune Begleiterkrankungen bei den MG-Patienten nicht ausgeschlossen werden, da die Aktivität der jeweiligen Erkrankung nicht erfasst wurde und da es sich um unterschiedliche Autoimmunerkrankungen mit unterschiedlichem Grad der T-Zell-Beteiligung handelt. Die Gefahr einer Verzerrung durch akute Infektionen wurde dadurch minimiert, dass nur solche Personen in die Studie eingeschlossen wurden, bei denen keine klinischen Zeichen einer Infektion vorlagen (s. Kap. 3.2).

Eine Schwierigkeit bei der wissenschaftlichen Untersuchung von Thymusgewebe stellt die mangelnde Verfügbarkeit des Gewebes dar. Postmortale Untersuchungen (Steinmann et al 1986, Jamieson et al. 1999) bringen das Risiko von Gewebeveränderungen, die durch die Todesursache oder den Sterbevorgang an sich hervorgerufen werden können, mit sich. Probeentnahmen von vitalem Thymusgewebe

sind im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe mit Sterniotomie möglich, jedoch werden solche Operationen naturgemäß eher bei älteren Menschen durchgeführt, also in einem Alter, in dem der Thymus zumeist bereits in Involution begriffen ist.

Dieses Problem spiegelt sich in der Gruppe der Kontrollpersonen wieder, die gegenüber den beiden MG-Gruppen ein signifikant erhöhtes durchschnittliches Alter und einen signifikant erhöhten Anteil von Männern aufweist. Dadurch könnte ein weiterer (Selektions-)Bias bedingt sein. Wie aus Tab 2.1 bereits ersichtlich ist, kommt die LOMG häufiger bei Männern vor, und bei der EOMG findet sich eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechts. Die Gründe für das bei Frauen erhöhte EOMG-Erkrankungsrisiko, das auch bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen besteht (Anaya 2012, Nussinovitch et Shoenfeld 2012), sind unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese erhöhte Autoimmunsuszeptibilität von Frauen wurde 2005 gefunden. So konnte bei MG-Patienten eine erhöhte Expression eines Östrogen-Rezeptors auf Thymozyten nachgewiesen werden (Nancy et Berrih-Aknin 2005).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Anzahl von V β -Expansionen CD4⁺-einfachpositiver PBL in den beiden Studiengruppen der MG-Patienten gegenüber den Normalkontrollen nachgewiesen werden. Beim Vergleich der beiden Gruppen von Myasthenie-Pat. untereinander zeigte sich kein signifikanter entsprechender Unterschied. Bei der Untersuchung der CD8⁺-einfachpositiven PBL zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der V β -Expansionen beim Vergleich der verschiedenen Studiengruppen untereinander.

Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur vorhandenen Daten, welche nahezu ausnahmslos ein gehäuftes Vorkommen von V β -Expansionen im Blut von Myasthenikern im Vergleich zu Normalkontrollen zeigen. Grunewald et al. fanden bei der FACS-Analyse der später auch von Truffault et al. im Thymus untersuchten 6 V β -Ketten (s. o.) auf CD4⁺- bzw. CD8⁺-positiven PBL von 15 MG-Patienten (darunter 14 Fälle mit Nachweis von nAChR-Ak) und 24 Kontrollpersonen bei 11 Patienten Expressionen einer oder mehrerer V β -Ketten, die über dem Maximum der Kontrollgruppe lagen, und bei 4 Patienten Expressionen, die um mehr als das Doppelte über dem Maximalwert der Normalkontrollen lagen. Statistische Tests wurden nicht durchgeführt (Grunewald et al. 1991). CD4⁺- und CD8⁺-PBL von 8 seropositiven MG-Patienten und 7 Normalkontrollen wurden von Gigliotti et al. hinsichtlich der

Expression von 22-V β -Ketten mittels PCR untersucht. Dabei wurden statistisch signifikante Überrepräsentationen von vier Ketten (V β 1, 13.2, 17 und 20) bei den MG-Patienten gefunden (Gigliotti et al. 1996). In einer Kohorte von 29 schwedischen MG-Patienten (davon 25 mit Nachweis von nAChR-Ak, 2 OMG- und 8 TAMG-Fälle), die mit 56 Normalkontrollen verglichen wurde, fanden Hjelmström et al. bei der flusszytometrischen PBL-Analyse von zwei V α - und zehn V β -Ketten einen signifikant höheren Anteil an MG-Patienten, die Expansionen aufwiesen, welche um mindestens 20% über dem Mittelwert der Normalkontrollen lagen (Hjelmström et al. 1997). Xu et al. untersuchten CD4⁺- und CD8⁺-PBL von 38 MG-Patienten und 57 Kontrollen mittels FACS und fanden bei 11 untersuchten V β -Ketten und 2 untersuchten V α -Ketten 43 Expansionen bei 18 MG-Patienten (sowohl bei CD4⁺- als auch bei CD8⁺-PBL) sowie 20 Expansionen, die sich auf 15 Normalkontrollen verteilten (nur auf den CD8⁺-PBL). Diese Anzahlen der Expansionen wurden nicht auf statistische Signifikanz hin untersucht. Es wurden jedoch statistisch signifikant verringerte Expressionen der V β -Kette 2 auf CD8⁺- und der V β -Kette 3 auf CD4⁺-PBL sowie eine statistisch signifikant erhöhte Expression von V β 13 bei den MG-Patienten festgestellt (Xu et al. 1998). Bei der Untersuchung von Blutproben von 7 MG-Patienten und 8 Normalkontrollen hinsichtlich des Vorkommens von 24 V β -Ketten mittels RT-PCR fanden Navaneetham et al. einen statistisch signifikant höheren Gebrauch der Ketten 4, 6, 15, 16 und 24 sowie einen signifikant niedrigeren Gebrauch der Ketten 12, 14, 17 und 18 bei den MG-Patienten (Navaneetham et al. 1998). V β -Expansionen auf PBL von 6 MG-Patienten (darunter ein Pat. mit TAMG) und 6 Normalkontrollen wurden mittels PCR von Infante et al. untersucht. Dabei wurden 26 V β -Ketten untersucht, und es wurden 12 Expansionen auf den CD4⁺- sowie 5 Expansionen auf den CD8⁺-PBL der MG-Patienten gefunden (jeweils mit einer Abweichung von mehr als zwei oder mehr als drei SD vom Mittelwert der Normalkontrollen) (Infante et al. 2003). Matsumoto et al. fanden bei der Untersuchung des V β -Ketten-Gebrauchs von 38 MG-Patienten und 44 Normalkontrollen mittels CDR3-Spectratyping signifikant weniger Fälle unter den MG-Patienten, die keine V β -Expansionen aufwiesen, als bei den Kontrollpersonen (Matsumoto et al. 2006). Eine signifikant höhere Anzahl an V β -Expansionen sowohl bei CD4⁺- als auch bei CD8⁺-PBL konnten Tackenberg et al. mittels Durchflusszytometrie bei 118 Patienten mit seropositiver, generalisierter MG (darunter 18 Fälle mit Thymom, 53 EOMG- und 47 LOMG-Pat.) im Vergleich zu 118 alters- und geschlechtsgematchten Normalkontrollen nachweisen (Tackenberg et al. 2007). Die

gleiche Arbeitsgruppe konnte später mit den gleichen Methoden bei 32 Patienten mit neu diagnostizierter EOMG, die nicht immunsuppressiv behandelt wurden und bei denen keine Thymektomie durchgeführt worden war, keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des relativen Anteils der Patienten mit V β -Expansionen auf CD8⁺-PBL finden (Tackenberg et al. 2009). Bezüglich des Einflusses immunsuppressiver Therapie auf V β -Expansionen liegen keine Literaturdaten vor.

Die vorliegende Arbeit bekräftigt den Befund von peripheren V β -Expansionen bei autoimmuner Frühmyasthenie. Es ergibt sich somit der Hinweis für eine Störung der peripheren Toleranz. Weitere Hinweise für extrathymische, immunregulatorische Veränderungen bei MG-Patienten, die an der Entstehung der Erkrankung beteiligt zu sein scheinen, ergaben sich bei Untersuchungen von Th17-Zellen, T_{reg} und den die Homöostase zwischen diesen beiden T-Zelltypen beeinflussenden Zytokinen. So wurden im Blut von MG-Patienten eine signifikant verringerte Anzahl von T_{reg} (Fattorossi et al. 2005, Li et al. 2008, Masuda et al. 2010) und eine eingeschränkte regulatorische Funktion dieser Zellen (Luther et al. 2009, Zhang et al. 2009, Thiruppathi et al. 2012) gefunden. In zwei anderen Studien hatte man allerdings keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Vorkommens von CD4⁺/CD25⁺-TC im Blut bzw. von Foxp3⁺/CD4⁺-TC im Thymus von MG-Patienten nachweisen können (Huang et al. 2004, Matsui et al. 2010). Allerdings konnte in einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass der Transfer von T_{reg} gesunder Ratten in Ratten mit EAMG zu klinischer Besserung und Herunterregulierung der humoralen nAChR-spezifischen Immunantwort führt (Aricha et al. 2008). T_{reg} spielen eine ausschlaggebende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und der peripheren Toleranz, indem sie die Aktivierung, Proliferation und Zytokin-Produktion von autoreaktiven T-Effektorzellen kontrollieren (Workman et al. 2009, Sakaguchi et al. 2010). Eine Imbalance von pathogenen Th17-Zellen und protektiven T_{reg} wurde bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen gefunden (Kleczynska et al. 2011, Ferraro et al. 2011, Niu et al. 2012) und scheint auch bei der MG eine Rolle zu spielen, denn die Applikation von gegen Interleukin-6 (IL-6) gerichteten Ak führte bei EAMG-Ratten durch Down-Regulation verschiedener Th17-Gene zu klinischer Besserung, reduzierter Anzahl von BC im Blut und Reduktion des nAChR-Ak-Titers. Bei IL-6 handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das bei der TC-Differenzierung einen „Switch“ von T_{reg} zugunsten von Th17-Zellen herbeiführt (Aricha et al. 2011). Roche et al. konnten

erhöhte Serum-IL-17-Spiegel mit Korrelation zum nAChR-Ak-Titer bei MG-Patienten zeigen (Roche et al. 2011).

Die Ergebnisse einer Studie zur Detektion von Toll-like-Rezeptor (TLR)-mRNA im Blut von MG-Patienten werfen ein Licht auf eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der Ätiopathogenese der MG. Bei 62 MG-Patienten und 62 Normalkontrollen wurde die TLR-mRNA-Expression auf zirkulierenden mononukleären Zellen (PBMC) untersucht, und es zeigten sich signifikante Unterschiede. TLR-1, -6 und -10 wurden bei der MG in vermindertem Ausmaß exprimiert, für TLR-2, -3, -4, -5, -8- und -9 fand sich eine erhöhte Expression. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Korrelation der Expression von TLR-9 mit dem klinischen Schweregrad der MG (QMG score) (Wang et al. 2013). TLR werden als Schlüsselkomponenten des angeborenen Immunsystems angesehen. Es handelt sich um Rezeptoren, die auf der Oberfläche von B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und bestimmten T-Zellen exprimiert werden, und die der unspezifischen Erkennung von molekularen Bestandteilen von Bakterien, Viren, Pilzen oder Protozoen dienen (Hurst et von Landenberg 2008). Nach der Bindung solcher microorganism associated molecular patterns (MAMPs) genannten Moleküle differenzieren DC zu antigen-präsentierenden Zellen, die dann über eine Interaktion mit dem TCR eine adaptive Immunantwort auslösen (Medzhitov 2001, Hoebe et al. 2004). Inadäquate Aktivierung von TLR-abhängigen Signalwegen könnte zur Initiierung oder Aufrechterhaltung einer Autoimmunreaktion führen (Papadimitraki et al. 2007). Dabei werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die eine Autoimmunisierung begünstigen könnten: (1) Verschiedene TLR können neben fremden auch körpereigene Moleküle binden, so z. B. Fibrinogen, Hyaluronsäure, heat shock protein, modifiziertes low density lipoprotein und Einzelstrang-RNA (Papadimitraki et al. 2007). (2) Die TLR-Aktivierung scheint zu einer spezifischen Immunantwort führen zu können, die sich aufgrund einer Ähnlichkeit der Zielstrukturen nicht nur gegen das fremde Molekül sondern auch gegen körpereigene Strukturen richtet („Molekulares Mimikry“). Die TLR-induzierte DC-Differenzierung mit verstärkter Fähigkeit zur Antigen-Präsentation kann dabei zu einer Verstärkung der Immunantwort führen (Papadimitraki et al. 2007). Allerdings kann eine dauerhafte TLR-9-Aktivierung auch zu einer Hemmung der DC-Differenzierung und Förderung der T_{reg}-Differenzierung anstelle von CD4⁺-positiven Effektorzellen führen (Moseman et al. 2004). Darüber hinaus wurde in einer Studie gezeigt, dass TLR-9 nach Kontakt mit DNA-Molekülen apoptotischer Zellen auch einen tolerogenen Effekt auf B-

Zellen ausüben kann (Miles et al. 2012). (3) TLR-abhängige Signaltransduktionswege werden als aktivierende Faktoren für T_{reg} diskutiert, und eine Störung dieser Signalwege könnte einen auto-immunisierenden pathogenetischen Mechanismus darstellen (Papadimitraki et al. 2007). Jedoch konnte in einer neueren Studie auch ein anti-immunregulatorischer Effekt von TLR-7 gezeigt werden. Die Aktivierung von DC durch TLR-7 führte bei Mäusen zu verminderter T_{reg} -Generierung aus naiven T-Zellen und zu eingeschränkter immunregulatorischer Funktion der T_{reg} (Hackl et al. 2011). (4) TLR-7, -8 und -9 scheinen autoreaktive B-Zellen aktivieren zu können (Green et Marshak-Rothstein 2011).

TLR-vermittelte Signalwege scheinen bei systemischem Lupus erythematoses (Pisetsky 2008), Rheumatoider Arthritis (Shotorbani et al. 2011), Diabetes mellitus Typ I (Lien et Zipris 2009) und Multipler Sklerose (Gambuzza et al. 2011) eine Rolle zu spielen. Der Einfluss von TLR auf die Pathogenese der MG ist bislang kaum untersucht worden.

Die Erforschung eines weiteren Bestandteils des angeborenen Immunsystems, der natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), erbrachte ebenso Hinweise für eine pathogenetische Beteiligung bei der MG. Im Blut von MG-Patienten mit Thymushyperplasie konnte eine erhöhte Anzahl reifer NK-T-Zellen nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit Glukokortikoiden und Thymektomie normalisierte sich dieser Befund (Suzuki et al. 2005). In einer anderen Studie konnte eine erhöhte Anzahl von NK-Zellen im Blut von MG-Patienten jedoch nicht gezeigt werden (Takahashi et al. 2007). EAMG tritt in NK-Zell-depletierten (nicht aber in NK-T-Zell-depletierten) Mäusen nach Immunisierung mit nAChR mit geringerer Inzidenz und geringerem Schweregrad auf als bei Wildtyp-Kontrollen. Darüber hinaus wurde bei den NK-Zell-depletierten Mäusen eine höhere Dichte von nAChR im Muskelgewebe als bei den Kontrollen gezeigt (Shi et al. 2000). Im Widerspruch zu diesen Befunden führte die Aktivierung von NK-T-Zellen mit einem synthetischen Glykolipid bei Mäusen zu verzögerter Manifestation und geringerer klinischer Ausprägung von EAMG. Nach späterer Applikation des Glykolipids (nach der Manifestation der EAMG) zeigte sich ebenso eine klinische Besserung. Dieser Effekt könnte aber auch dadurch erklärt werden, dass das verwendete Glykolipid T_{reg} induziert (Liu et al. 2005).

Hinsichtlich der Anzahl von V β -Expansionen im Thymus fanden sich in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen der Studienteilnehmer (MG IS, MG NT und CTRL). Dieser Befund deckt sich

weitestgehend mit den wenigen bislang veröffentlichten Ergebnissen aus Arbeiten, die sich mit der Frage der zentralen Expansionen beschäftigten. Truffault et al. untersuchten 17 Thymi von MG-Patienten und 8 Thymi von Normalkontrollen bezüglich des Vorkommens von 6 V β -Ketten (V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 6.7, V β 8, V β 12) auf TC mittels Flusszytometrie und fanden zwar ein signifikant erhöhtes relatives Vorkommen von V β 5.1 und V β 8 im Thymus der MG-Patienten (Truffault et al. 1997). Jedoch fanden Navaneetham et al. bei der Untersuchung von 10 Thymi von MG-Pat. und 4 Thymusproben von Normalkontrollen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gebrauchs von 24 V β -Ketten mit lediglich einer Ausnahme (V β -Kette 2), bei der ein leicht, aber signifikant verringertes Vorkommen ($p < 0,03$) in der Gruppe der Normalkontrollen nachgewiesen werden konnte. Die Expression der verschiedenen V β -Ketten war mittels RT-PCR untersucht worden (Navaneetham et al. 1998). In diesen beiden Studien waren die relativen Anteile verschiedener V β -Ketten im Thymus von MG-Pat. mit denen von Normalkontrollen verglichen worden. In einer späteren Studie wurden in 6 MG-Thymi mit LFH und 3 Thymusproben von MG-Patienten, die in Nachbarschaft zu Thymomgewebe lagen, keine V β -Expansionen bei der Untersuchung von 25 V β -Ketten mittels CDR3-Spectratyping gefunden (Matsumoto et al. 2006).

Die Ergebnisse sprechen gegen eine intrathymische Expansion von T-Zellen bei der autoimmunen Frühmyasthenie. Liegt der Ort der primären Autoimmunantwort bei der autoimmunen Frühmyasthenie also extrathymisch? Ereignet sich der entscheidende Pathomechanismus an der neuromuskulären Synapse oder im Lymphknoten? Diese Hypothese hält den Resultaten aus der Analyse der intrathymischen T-Zell-Reifungsstadien nicht stand.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikant höherer relativer Anteil der doppeltpositiven Reifungsstadien DP II und DP III sowie der Stadien SP4 I und SP4 II in der Gruppe der immunsuppressiv-naiven Myasthenie-Patienten im Vergleich zu den Normalkontrollen nachgewiesen. Beim Vergleich der zum Zeitpunkt der Thymektomie bereits immunsuppressiv behandelten Pat. mit den Normalkontrollen zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen des Stadium DP II bei den Normalkontrollen und der Stadien SP4 II und III sowie SP8 I und II in der Gruppe MG IS. Die relative Häufigkeit der doppeltpositiven Reifungsstadien und des Stadium SP4 I lag in der Gruppe MG NT signifikant höher als in der Gruppe MG IS, für die Reifungsstadien SP4 II und SP8 II ergab sich eine umgekehrte Relation.

In der Literatur findet man kaum Daten zum Vorkommen verschiedener Reifungsstadien von TC im myasthenen Thymus. Insbesondere die Reifungsstadien nach Vanhecke et al. 1995 sind bei Myasthenikern bislang nicht untersucht worden. Die in den letzten Jahren veröffentlichten Studien, bei denen TC-Reifungsstadien im myasthenen, nichtthymomatösen Thymus untersucht wurden, beschäftigten sich lediglich mit dem Vorkommen der T-Zell-Grundpopulationen, welche durch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der Oberflächenproteine CD4 und CD8 charakterisiert werden. So fanden Durelli et al. bei der Untersuchung von 14 Thymusproben immunsuppressiv-naiver Pat. mit generalisierter MG im Alter von 20-67 Jahren, bei denen kein Thymom nachgewiesen werden konnte, und 10 Kontrollen kardiologischer Patienten ein signifikant häufigeres Vorkommen von $CD4^+/CD8^-$ - und $CD4^-/CD8^+$ -TC in den Thymi der MG-Pat. Der Anteil der $CD4^+/CD8^+$ -doppelpositiven war im Thymus der MG-Pat. geringer ausgeprägt (statistisch allerdings nicht signifikant) (Durelli et al. 1990). Diese Ergebnisse (signifikant höherer Anteil der $CD4^+/CD8^-$ - und der $CD4^-/CD8^+$ -TC und (in diesem Fall auch mit Nachweis einer statistischen Signifikanz) geringerer Anteil $CD4^+/CD8^+$ -doppelpositiven TC im myasthenen Thymus) wurden durch Ichikawa et al. in einer Untersuchung von acht MG-Patienten ohne Thymom (davon drei immunsuppressiv behandelt) und 15 Kontrollen (Kinder mit kongenitaler Herzerkrankung) bestätigt (Ichikawa et al. 1992). In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1992 konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich $CD4^+/CD8^-$ -, $CD4^+/CD8^-$ - oder $CD4^-/CD8^+$ -TC beim Vergleich myasthener Thymi mit Normalkontrollen gezeigt werden. Dabei wurden 16 Thymi von Patienten mit generalisierter MG (Alter 12-51 Jahre, in 14 Fällen Nachweis von nAChR-Ak, in zwei dieser Fälle Einnahme von Prednison) mit 14 Normalkontrollen verglichen (Fujii et al. 1992). Ein Jahr später fanden Damjanović et al. bei der flusszytometrischen Untersuchung von Ratten-Thymi, bei denen Myasthenia gravis durch Injektion von AChR-Protein induziert worden war (EAMG), eine signifikante Verringerung des Anteils $CD4^+/CD8^+$ -doppelpositiver TC und einen signifikant erhöhten Anteil der $CD4^+/CD8^-$ - und der $CD4^-/CD8^+$ -einfachpositiven TC im Vergleich zu Kontrollen (Damjanović et al. 1993). Auch die Untersuchungen von Kosec et al. ergaben eine signifikante Verringerung der $CD4^+/CD8^+$ -doppelpositiven TC bei MG-Patienten. Bezüglich der $CD4^+/CD8^-$ -TC wurde eine signifikante Erhöhung gegenüber Kontrollen festgestellt. Es waren 15 Thymi weiblicher, immunsuppressiv-naiver MG-Pat. ohne Thymom (Alter 20-40 Jahre) und 10 Thymi weiblicher Kontrollen (Alter 2-20

Jahre) mittels Flusszytometrie untersucht worden (Kosec et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Studien sind nur eingeschränkt mit denjenigen der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da jeweils nur die Grundpopulationen der T-Zellen im Thymus untersucht wurden. Der Befund eines gegenüber Normalkontrollen erhöhten Anteils von $CD4^+/CD8^-$ - und $CD4^-/CD8^+$ -einfachpositiven TC, welcher in allen genannten Studien mit Ausnahme der Veröffentlichung von Fujii et al. erhoben wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (erhöhtes Vorkommen $CD4^+/CD8^-$ -TC in den Gruppen MG IS und MG NT und $CD4^-/CD8^+$ -TC in der Gruppe MG IS gegenüber Normalkontrollen). Bezüglich der $CD4^+/CD8^+$ -doppeltpositiven TC, welche Ichikawa et al., Damjanović et al. und Kosec et al. bei Myasthenikern in verringerter Häufigkeit gegenüber Normalkontrollen nachwiesen, ergibt sich in der vorliegenden Arbeit ein differenzierter Befund. In der Gruppe MG NT waren die Reifungsstadien DP II und DP III häufiger, in der Gruppe MG IS hingegen war das Stadium DP II seltener nachweisbar als bei Normalkontrollen.

Klonale Deletion stellt den essentiellen Mechanismus für die negative Selektion von autoreaktiven Thymozyten dar. Dabei werden reifenden, positiv selektionierten Thymozyten Selbst-Antigene von den mTEC präsentiert. Zu diesen Selbst-Antigenen zählen auch sogenannte gewebe-gebundene Antigene (tissue-restricted antigens, TRA), die sonst nur in spezifischen extrathymischen Organen anzutreffen sind, wie z. B. der nAChR (Aricha et al. 2012). Viele dieser TRA-Präsentationen sind vom Transkriptionsfaktor Aire abhängig, für den das Autoimmunregulator (AIRE)-Gen codiert und der in hoher Dichte auf mTECs exprimiert wird (Anderson et al. 2005). Mutationen im AIRE-Gen führen zu autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), einer seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Autoimmunerkrankung, bei der sich destruktive, überwiegend antikörper-vermittelte Immunreaktionen gegen individuell unterschiedliche Organe ereignen (De Martino et al. 2013). mTECs AIRE-defizienter Mäuse enthalten geringere Mengen an mRNA-CHRNA1-Transkripten als mTECs von Wildtyp-Mäusen (Scarpino et al. 2007). CHRNA1 codiert für die α -Untereinheit des nAChR, und für Polymorphismen in diesem Gen wurde ein Zusammenhang mit MG nachgewiesen (Djabiri et al. 1997), Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass AIRE-knockout-Mäuse gegenüber Kontrollen eine signifikant geringere Anzahl an T_{reg} und eine gesteigerte Expression von Th17-Markern aufweisen. Die aus diesen Befunden gefolgerte erhöhte Suszeptibilität für EAMG bei AIRE^{-/-}-Mäusen konnte jedoch nur bei älteren Tieren

nachgewiesen werden. Bei jungen AIRE-knockout-Mäusen zeigte sich ein entgegengesetzter Befund mit geringerem Schweregrad der EAMG gegenüber Wildtyp-Mäusen. Dieses Ergebnis wurde auf die bei den jungen AIRE-defizienten Mäusen nachgewiesene erhöhte Anzahl von T_{reg} in der Milz zurückgeführt (Aricha et al. 2012). Der Mechanismus der negativen Selektion ist in der Thymusmedulla lokalisiert und ereignet sich im Reifungsstadium des Übergangs von DP- zu SP-Thymozyten (Hogquist et al. 2005).

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich der Gruppen MG NT und CTRL eine signifikant gesteigerte Häufigkeit des spät-doppeltpositiven Stadium DP III und des früh- CD4⁺-einfachpositiven Stadium SP4 I in der Gruppe der unbehandelten MG-Patienten nachgewiesen wurde, spricht also für eine Störung der negativen Selektion und somit der zentralen Toleranz bezüglich CD4⁺-TC bei Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie. Dieser Hinweis für eine Beteiligung von intrathymischen Veränderungen an der Pathogenese der EOMG deckt sich mit einer Fülle von Daten aus der wissenschaftlichen Literatur, die im Folgenden zusammengefasst werden.

Neben der Tatsache, dass EOMG-Patienten klinisch von einer Thymektomie profitieren (und dabei korreliert das Ausmaß der klinischen Besserung mit der Ausprägung der lymphofollikulären Hyperplasie und der Dichte der Lymphozyten-Infiltrate im entfernten Thymus) (Olanow et al. 1987, Genkins et al. 1993, Gronseth et Barohn 2000, Mantegazza et al. 2003, Mori et al. 2007), sprechen auch paraklinische Beobachtungen für eine Beteiligung von intrathymischen Veränderungen an der Pathogenese der EOMG: (1) Die in diesem Zusammenhang wichtigsten Ergebnisse wurden schon in den 70er und 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gefunden: In Thymi von EOMG-Patienten können eine intrathymische Produktion von Auto-Ak (Vincent et al. 1978), eine erhöhte Anzahl von B-Zellen (Abdou et al. 1974), Plasmazellen (Willcox et al. 1984, Gomez et al. 2011) und Keimzentren (Kornstein et al. 1984) gefunden werden. (2) In hyperplastischen MG-Thymi konnten autoreaktive T-Zellen (Melms et al. 1988) und nAChR-Ak-produzierende Plasmazellen (Hill et al. 2008) nachgewiesen werden. (3) MG-Patienten mit hyperplastischem Thymus haben höhere nAChR-Ak-Titer als MG Patienten mit Thymusinvolution oder Thymom (Berrih-Aknin et al. 1987). (4) Transplantiert man SCID-Mäusen Gewebeproben von hyperplastischen EOMG-Thymi, so lassen sich ein bis zwei Wochen später nAChR-Ak im Serum dieser Mäuse

nachweisen (Schönbeck et al. 1992). (5) Die nAChR-Ak-Titer sind bei EOMG-Patienten nach der Thymektomie oft signifikant verringert, und das Ausmaß der Titer-Reduktion korreliert mit der Anzahl der B-Zellen in den Keimzentren des entfernten Thymus (Okumura et al. 2003). (6) Thymische Myoidzellen (TMC), die in großer Zahl in der Medulla von Normal- und EOMG-Thymi vorkommen, exprimieren den adulten und den fetalen nAChR (Wekerle et al. 1975, Kao et Drachman 1977, Schluep et al. 1987). Fetale nAChR, die anstelle der adulten ϵ -Untereinheit eine γ -Untereinheit aufweisen, werden beim Erwachsenen in aller Regel ausschließlich von TMC exprimiert (Schluep et al. 1987). Im Blut von EOMG-Patienten können Ak gegen den fetalen nAChR nachgewiesen werden (Weinberg et Hall 1979). (7) Im Thymus von EOMG-Patienten kann eine gegen TMC gerichtete Autoimmunreaktion nachgewiesen werden (Roxanis et al. 2002, Leite et al. 2007). (8) Im Thymus von EOMG-Patienten wurden in enger Nachbarschaft zu TMC dendritische Zellen (DC) gefunden, die wahrscheinlich aktivierten autoreaktiven TC nAChR-Peptide präsentieren (Kirchner et al. 1986). (9) In Thymi von EOMG-Patienten konnte die Überexpression einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen wie APRIL und BAFF (Thangarajh et al. 2006), CXCL 12 (Weiss et al. 2013), CXCL 13 (Meraouna et al. 2006) und CCL 21 (Berrhi-Aknin et al. 2009) gezeigt werden. B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1, CXCL13) ist ein Chemokin, das an Burkitt's lymphoma receptor 1 (BLR1, CXCR5) auf B-Zellen bindet und dadurch zu chemotaktischer Attraktion („Homing“) in lymphatische Organe führt (Legler et al. 1998). CCL21 wird von medullären thymischen epithelialen Zellen (mTEC) und hoch-endothelialen Venolen (HEV) gebildet und bindet an seinen Liganden CCR7, der in großer Dichte auf naiven T-Zellen exprimiert wird. Diese Interaktion führt zu Migration von Thymozyten in die Thymusmedulla und zur Immigration von naiven T-Zellen in lymphatische Organe über HEV (Legler et al. 1998, Cyster 2005). CXCL12 ist ein Chemokin, das von HEV exprimiert wird und durch Interaktion mit seinem Rezeptor CXCR4 auf antigenpräsentierenden Zellen und B-Lymphozyten wahrscheinlich zu einer Rekrutierung dieser Zellen aus der Peripherie in den Thymus führt (Weiss et al. 2013). Insgesamt kommt es wahrscheinlich zu einer verstärkten Chemotaxis von DC und B-Zellen in den Thymus (Berrhi-Aknin et al. 2013). (10) Bei etwa 80% der EOMG-Patienten finden sich histopathologische Thymusveränderungen (Leite et al. 2007). (11) Bei intrathymischen regulatorischen TC (T_{reg}) konnten Funktionsdefizite nachgewiesen werden (Balandina et al. 2005).

In einer Microarray-Assoziationsstudie konnte in hyperplastischen Thymi von MG-Patienten eine erhöhte Expression von IFN-regulierten Genen im Vergleich zu alters- und geschlechts-gematchten Kontrollen gezeigt werden (Poëa-Guyon et al. 2005). IFN- γ besitzt pro-inflammatorische Eigenschaften (Induzierung der Expression von HLA-I- und HLA-II-Genen, Förderung der Th1-Differenzierung naiver CD4⁺-einfachpositiver Lymphozyten) (Cavalcante et al. 2013) und führt in transgenen Mäusen zu einem myasthenen Syndrom mit klinischer Besserung nach Applikation von Cholinesterasehemmern und Nachweis von mononukleären Zellen und Autoantikörpern im Bereich der motorischen Endplatten (Gu et al. 1995). Bei IFN- γ - bzw. IFN- γ -Rezeptor-knockout-Mäusen wurden nach nAChR-Immunisierung eine verringerte Produktion von nAChR-spezifischen Antikörpern und eine verringerte klinische Suszeptibilität für EAMG im Vergleich zu Wildtypmäusen gezeigt (Balasa et al. 1997, Zhang et al. 1999). Diese Befunde sprechen neben der Beteiligung des Thymus für eine pathogenetische Rolle von IFN- γ bei der Entstehung der MG.

Auch hinsichtlich der Interferone IFN- α , - β sowie - $\lambda 1$ und - $\lambda 2$ wurden intrathymische Veränderungen nachgewiesen. Eine thymische Transkriptom-Analyse zeigte bei MG-Patienten eine gegenüber Normalkontrollen gesteigerte Expression von IFN- α -induzierten Genen bei MG-Patienten (Poëa-Guyon et al. 2005, Le Panse et al. 2008), und Cavalcante et al. fanden eine signifikante Überexpression von IFN- $\lambda 1$ und - $\lambda 2$ im Thymus von MG-Patienten im Vergleich zu Patienten, die nicht an MG erkrankt waren (Cavalcante et al. 2013). Cufi et al. fanden im Thymus von MG-Patienten eine Überexpression von IFN- β (Cufi et al. 2013).

Ähnlich den oben angesprochenen Auffälligkeiten im Blut von MG-Patienten (s. o.) finden sich auch einige Daten aus Untersuchungen zu intrathymischen Aberrationen der TLR-Expression, die auf eine pathogenetische Beteiligung von TLR bei der MG hindeuten. Bei der Detektion von TLR-mRNA in Thymusgewebe von MG-Patienten fand sich eine signifikant erhöhte Expression von TLR-4 in hyperplastischen Thymi mit diffuser B-Zell-Infiltration (Thymitis) und in involutierten Thymi im Vergleich zu Thymomen und hyperplastischen Thymi mit Keimzentren (LFH). Bei den Thymitis-Fällen konnte eine überwiegende Lokalisation von TLR-4-positiven epitheloiden (zytokeratin-positiven) Zellen in enger Nachbarschaft zu nAChR-positiven TMC in der Medulla nachgewiesen werden (Bernasconi et al. 2005). In Zellkulturen humaner thymischer Epithelzellen konnte nachgewiesen werden, dass eine Inkubation mit einem

synthetischen dsRNA-Analogen, poly(I;C), zu gesteigerter Expression der α -Untereinheit des nAChR führt. Dieser Effekt wird über TLR-3, protein kinase R (PKR) und IFN- β vermittelt. Eine gesteigerte Expression ebendieser Proteine, die an antiviralen Immunantworten beteiligt sind, konnte in MG-Thymi nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass poly(I;C)-Injektionen in Wildtyp-Mäusen, nicht aber in IFN- α -knockout-Mäusen zu gesteigerter thymischer Expression der α -Untereinheit des nAChR, gesteigerter Produktion von nAChR-Ak, Proliferation von B-Zellen und MG-ähnlichen Symptomen führt (Cufi et al. 2013). Im Thymus fand sich keine Veränderung der Frequenz von NK- oder NK-T-Zellen (Suzuki et al. 2005).

Wo aber findet nun die primäre Autoimmunantwort statt, wo ereignet sich der entscheidende Pathomechanismus? Kommt es aufgrund einer Störung peripher-regulatorischer Mechanismen zu einer gegen den nAChR-Ak gerichteten Immunisierung in der Peripherie mit anschließender Immigration von aktivierten CD4⁺-einfachpositiven Lymphozyten in den Thymus? Und ist die EOMG-typische Thymushyperplasie somit nur als sekundäre Begleiterscheinung anzusehen? TC exprimieren nach ihrer Aktivierung CD69 auf ihrer Zelloberfläche (Testi et al. 1994, Sathaliyawala et al. 2013, Ishikawa et al. 2013). Das Molekül lässt sich zwei bis drei Stunden nach der Aktivierung nachweisen, erreicht nach 18 bis 24 Stunden die höchste Dichte auf der Zelloberfläche und wird mit einer Halbwertszeit von etwa 24 Stunden wieder herunterreguliert, falls das stimulierende Antigen nicht mehr mit dem TCR interagiert (Testi et al. 1989). Wenn also peripher immunisierte und aktivierte CD4⁺-einfachpositive Lymphozyten in den Thymus immigrieren, so müssten sie dort unter den reifen CD69⁺- und CD4⁺-einfachpositiven Lymphozyten zu finden sein, da ihnen dort der nAChR von dendritischen Zellen bzw. nAChR-Untereinheiten von mTEC präsentiert werden (Leite et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte ein häufigeres Vorkommen des Reifungsstadium SP4 III bei unbehandelten EOMG-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen jedoch nicht nachgewiesen werden. Gegen die Hypothese einer peripheren Immunisierung von CD4⁺-einfachpositiven Lymphozyten sprechen auch die Tatsachen, dass im Thymus von MG-Patienten eine etwa zehnfach höhere Produktion von nAChR-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte als im Blut, im Knochenmark oder in Lymphknoten (Fujii et al. 1986) und dass durch periphere Immunisierung mit nAChR bei Ratten keine inflammatorische Thymushyperplasie herbeigeführt werden konnte (Meinl et al. 1991).

Die vorliegenden Ergebnisse legen vielmehr einen anderen Schluss nahe: aufgrund einer Störung der zentralen Toleranz kommt es zum Überleben von $CD4^{+}$ -einfachpositiven Lymphozyten, deren TCR den nAChR erkennt. Die Zellen expandieren jedoch nicht im Thymus, sondern erst nach der Emigration in die Peripherie, wo eine Störung der peripheren Toleranz ihr Überleben begünstigt.

Die Anzahl der V β -Expansionen wird in der vorliegenden Studie durch eine immunsuppressive Behandlung nicht beeinflusst. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise für periphere Therapieeffekte immunsuppressiver Medikation bei Myasthenia gravis. So fanden Fattorossi et al., dass die Anzahl von T_{reg} im Blut von Myasthenie-Patienten unter immunsuppressiver Medikation (Glukokortikoide oder Glukokortikoide plus Azathioprin) zunimmt. Dabei wurden neben EOMG- auch MAMG-, LOMG- und TAMG-Fälle in die Studie eingeschlossen (Fattorossi et al. 2005). Luther et al. konnten bei der Untersuchung von Blutproben von EOMG-, LOMG- und TAMG-Patienten zeigen, dass T_{reg} von MG-Patienten, die mit Prednisolon behandelt wurden, eine bessere autoimmun-suppressive Funktion aufwiesen als T_{reg} unbehandelter MG-Patienten (Luther et al. 2009), sodass sich der Hinweis für einen autoimmun-suppressiven Effekt von Glukokortikoiden auf periphere immunregulatorische Mechanismen ergibt.

Der Einfluss immunsuppressiver Medikation auf T-Zell-Reifungsstadien im myasthenen Thymus wurde von Berrih et al. untersucht. Es wurde über eine signifikante Verringerung des relativen Anteils $CD4^{+}/CD8^{+}$ -doppeltpositiver TC und dementsprechend eine Erhöhung des Anteils $CD4^{+}/CD8^{-}$ - bzw. $CD4^{-}/CD8^{+}$ -einfachpositiver TC vor allem bei jungen (< 20 Jahre) mit Prednison behandelten MG-Patienten berichtet, welche mit unbehandelten MG-Patienten und Normalkontrollen verglichen wurden (Berrih et al. 1984). Zu dem gleichen Ergebnis kamen Fattorossi et al. bei der Analyse von 33 EOMG-Patienten, von denen 14 mit Prednison und zwei mit Prednison und Azathioprin behandelt wurden (Fattorossi et al. 2008).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Reduktion des relativen Anteils aller $CD4^{+}/CD8^{+}$ -doppeltpositiver Reifungsstadien (DP I, II und III) an der Gesamtpopulation der Thymozyten in der Gruppe MG IS – verglichen mit der Gruppe MG NT – nachgewiesen. Neben dem Reifungsstadium DP III ist auch das Stadium SP4 I in der Gruppe MG IS mit geringerer Häufigkeit nachweisbar als in der Gruppe der immunsuppressiv-naiven MG-Patienten. Da gerade in diesen beiden Reifungsstadien die negative Selektion autoreaktiver Thymozyten stattfindet (s. o.), sprechen diese

Daten für einen intrathymischen Wirkungsmechanismus immunsuppressiver Medikation bei autoimmuner Frühmyasthenie, der die negative Selektion autoreaktiver CD4⁺-TC in der Medulla fördert.

Der Einfluss von CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten auf die Ätiologie bzw. die Pathogenese der EOMG spielt in der wissenschaftlichen Debatte bislang nur eine untergeordnete Rolle. Dies wird der Tatsache, dass in einer genom-weiten EOMG-Assoziationsstudie die stärkste Assoziation in der HLA-I-Region gefunden wurde (Gegersen et al. 2012), jedoch nicht gerecht. In zwei Veröffentlichungen wird CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten eine immunregulatorische Funktion zugeschrieben (Protti et al. 1993, Yuen et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte weder im Thymus noch im Blut der MG-Patienten ein signifikant erhöhtes Vorkommen von expandierten CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten gegenüber Normalkontrollen nachgewiesen werden. Der Befund von signifikant vermehrten Vβ-Expansionen auf CD8⁺-PBL von MG-Patienten gegenüber Normalkontrollen, der in einer früheren Studie erhoben worden war (Tackenberg et al. 2007), konnte somit nicht reproduziert werden. In der genannten Studie lag der Fokus allerdings auf der LOMG.

Und auch bei der Analyse der Reifungsstadien ergab sich kein klarer Hinweis für die pathogenetische Rolle von CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten bei der autoimmunen Frühmyasthenie. So konnte bei unbehandelten EOMG-Pat. kein signifikant höherer relativer Anteil des Reifungsstadiums SP8 I im Vergleich zu Normalkontrollen nachgewiesen werden, sodass sich somit kein Hinweis für eine Störung der negativen Selektion von CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten im Thymus ergibt. Es fällt jedoch auf, dass in den Thymusproben der immunsuppressiv behandelten MG-Patienten ein signifikant häufigeres Vorkommen der beiden CD8⁺-einfachpositiven Reifungsstadien SP8 I und SP8 II im Vergleich zu Normalkontrollen nachgewiesen wurde. Und das Reifungsstadium SP8 II war darüber hinaus bei den immunsuppressiv behandelten MG-Patienten signifikant häufiger anzutreffen als bei den immunsuppressiv-naiven MG-Patienten. Möglicherweise ist dieser Befund eine Folge der gegenüber den unbehandelten MG-Patienten signifikant verringerten doppelpositiven Reifungsstadien bei den immunsupprimierten MG-Patienten im Sinne einer durch die immunsuppressive Behandlung ausgelösten „Rechtsverschiebung“ von unreifen (doppelpositiven) zu reifen (einfachpositiven) Stadien der Thymozytenentwicklung. Von diesem Befund ausgenommen werden muss jedoch das Reifungsstadium SP4 I, dessen Vorkommen in

der Gruppe MG IS signifikant verringert ist im Vergleich zur Studiengruppe MG NT. Dieser Befund kann als Hinweis für eine die negative Selektion begünstigende Wirkung von Cortikosteroiden bzw. von Azathioprin gedeutet werden (siehe oben). Die Rolle von CD8⁺-einfachpositiven Lymphozyten bei der (early-onset) MG muss noch geklärt werden.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein großes Kollektiv von Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie und immunologisch gesunden Kontrollpersonen hinsichtlich des TCR-V β -Gebrauchs und der Thymozyten-Reifungsstadien sowie des diesbezüglichen Einflusses einer immunsuppressiven Behandlung untersucht. Dabei wurden erstmals die von Vanhecke et al. vorgeschlagenen, differenzierten T-Zell-Reifungsstadien bei MG-Patienten analysiert. Interessanterweise ergeben sich hier exakt in jenen Reifungsstadien CD4⁺-einfachpositiver TC solche Veränderungen, die für eine Störung der negativen Selektion (und damit der zentralen Toleranz) bei der autoimmunen Frühmyasthenie und für eine (zumindest teilweise) Beseitigung dieser Störung durch eine immunsuppressive Behandlung sprechen. Die Tatsache, dass die vorliegenden Ergebnisse eine signifikant höhere Anzahl von V β -Expansionen im Blut von Patienten mit autoimmuner Frühmyasthenie im Vergleich zu Normalkontrollen zeigen, und dass im Thymus keine solchen Unterschiede nachweisbar sind, spricht für eine Störung der peripheren Toleranz.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse und Überlegungen erscheinen Therapieversuche bei autoimmuner Frühmyasthenie sowohl zur Verbesserung der zentralen als auch der peripheren Toleranz sinnvoll. So könnte durch Behandlung mit IL-17- oder IL-6-Ak bzw. IL-17- oder IL-6-Rezeptor-Antagonisten ein peripher-regulatorisches Milieu gefördert werden. Tocilizumab, ein monoklonaler IL-6-Rezeptor-Antagonist, ist bereits für die Behandlung von Patienten mit Rheumatoider Arthritis, systemischer juveniler idiopathischer Arthritis oder polyartikulärer juveniler idiopathischer Arthritis zugelassen. Brodalumab und Ixekizumab, jeweils gegen IL-17 gerichtete Ak, wurden mit positiven Ergebnissen in Phase-II-Studien zur Behandlung von Patienten mit Psoriasis getestet (Papp et al. 2012, Leonardi et al. 2012). Darüber hinaus hatte die Behandlung von EAMG-Mäusen mit GM-CSF einen induzierenden bzw. expansiven Effekt auf nAChR-spezifische T_{reg} und führte zu klinischer Besserung (Sheng et al. 2011).

Eine ganze Reihe neuer Wirkstoffe, die mit intrazellulären Signalwegen von TC oder Mechanismen der Antigenpräsentation interferieren, kommen ebenso für eine Behandlung von MG-Patienten in Betracht. Alemtuzumab, ein CD52-Ak, führt beispielsweise durch Apoptose-Induktion zu lang anhaltender Lymphozyten-Depletion (Flynn et Byrd 2000), zeigt einen therapeutischen Nutzen bei CIDP (Marsh et al. 2010) und steht vor der Zulassung zur Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose (RR-MS). Daclizumab bindet an CD25 (IL-2-Rezeptor) und inhibiert so die durch IL-2 getriggerte TC-Proliferation. Es handelt sich um einen gut verträglichen Wirkstoff, der viel versprechende Ergebnisse bei Behandlung von RR-MS-Patienten aufweist (Wynn et al. 2010). Die sich an die Bindung von IL-2 an CD25 anschließenden Signalwege können durch Tofacitinib, einen oralen JAK-Inhibitor, gehemmt werden. In vitro führt dies zu verminderter Th2- und Th17-Differenzierung und abgeschwächter Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und Interferon- γ . Der Wirkstoff wurde bereits erfolgreich bei Colitis ulcerosa und Rheumatoider Arthritis eingesetzt (Sandborn et al. 2012, Van Vollenhoven et al. 2012, Fleischmann et al. 2012).

Neue Ansätze zur Erforschung der Pathogenese der MG resultieren aus der Entdeckung eines neuen Antigens (LRP4, Higuchi et al. 2011) und den Ergebnissen der bereits erwähnten genom-weiten Assoziationsstudie. In dieser Studie wurden 649 nordeuropäische EOMG-Patienten untersucht. Hier zeigte sich die stärkste Assoziation in der HLA-I-Region, wobei das hauptsächlich assoziierte Allel HLA-B*08 ist. Darüber hinaus wurden Assoziationen mit protein tyrosine phosphatase nonreceptor-22 (PTPN22) und einer Variante ($^{151}\text{Pro} \rightarrow \text{Ala}$) im TNFAIP3-interacting protein 1 (TNIP1) nachgewiesen (Gegersen et al. 2012). Eine Assoziation von PTPN22-Polymorphismen wurde bereits in früheren Untersuchungen gezeigt (Giraud et al. 2008, Burn et al. 2011), bei TNIP1 handelt es sich jedoch um ein neues Kandidaten-Gen außerhalb der HLA-Gene, für die bereits eine klare Assoziation nachgewiesen werden konnte (Vandiedonck et al. 2005).

Neben der Rolle von CD8^+ -einfachpositiven Lymphozyten muss auch der pathogenetische Einfluss des angeborenen Immunsystems noch tiefergehend erforscht werden. Die erhöhte MG-Suszeptibilität von Frauen und Umweltfaktoren wie Epstein-Barr-Virus(EBV)-Infektionen oder der Einfluss von Vitamin D stellen ebenso Forschungsfelder dar, die noch nicht hinreichend bearbeitet wurden. Bei MG-Patienten konnte eine erhöhte Expression eines Östrogen-Rezeptors auf Thymozyten

nachgewiesen werden (Nancy et Berrih-Aknin 2005), und Askmark et al. fanden bei MG-Patienten signifikant verringerte Vitamin-D-Serumspiegel im Vergleich zu Normalkontrollen (Askmark et al. 2012). Die Frage, ob EBV die Entstehung von MG begünstigt, ist Gegenstand einer kontroversen Debatte geworden (Serafini et al. 2011).

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab	antibody (Antikörper)
AIRE	Autoimmunregulator-Gen
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APECED	Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
APRIL	a proliferation inducing ligand
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
BC	B-Zellen
BCA-1	B cell-attracting chemokine 1 (CXCL13)
BLR1	Burkitt's lymphoma receptor 1 (CXCR5)
°C	Grad Celsius
C3	Komplementfaktor C3
CD	Cluster of differentiation
CDR	complementary determining region
CH	Pyridostigmin
CIDP	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CTLA4	cytotoxic lymphocyte-associated protein-4
CTRL	Studiengruppe der Normalkontrollen
CXCL13	B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1)
CXCR5	Burkitt's lymphoma receptor 1 (BLR1)
D	diversity (gene)
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt-positiv
dsRNA	doppel-strängige RNA
EAMG	experimentelle autoimmune Myasthenia gravis
EBV	Epstein-Barr-Virus

EOMG	generalisierte „early-onset“ Myasthenia gravis
FACS	fluorescence activated cell sorting (= Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward scatter
GC	germinal centres (Keimzentren)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEV	hoch-endotheliale Venole
HLA	human leukocyte antigen
IFN	Interferon
Ig(c)	regelmäßige Applikation von intravenösen Immunglobulinen
IgG	Immunglobulin-Subtyp G
IL	Interleukin
IM	Immunsuppressivum
IVIg	intravenöse Immunglobuline
J	joining (gene)
JAK	Janus Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LFH	lymphofollikuläre Hyperplasie
LRP4	low-density lipoprotein receptor-related protein 4
m	männlich
MAMPs	microorganism associated molecular patterns
Mg	Milligramm
MG	Myasthenia gravis
MGFA	Myasthenia Gravis Foundation of America
MG IS	Studiengruppe der immunsuppressiv behandelten MG-Patienten
MG NT	Studiengruppe der zum Zeitpunkt der Thymektomie immunsuppressiv-naiven MG-Patienten

ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mTEC	medullary thymic epithelial cells
MUSK	Muskel-spezifische Tyrosin-Kinase
µl	Mikroliter
nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NT	no treatment (keine (immunsuppressive) Therapie)
OMG	okuläre Myasthenia gravis
PBL	peripheral blood lymphocyte
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerithrin
PE(a)	Plasmaseparationen zur Behandlung einer akuten Verschlechterung
PerCP	Peridinin Chlorophyll a-Protein
PKR	protein kinase R
PR	Prednison, Prednisolon oder Methylprednisolon
PS	Plasmapherese
PTPN22	protein tyrosine phosphatase nonreceptor-22
QMG score	quantitative MG score
RR-MS	schubförmig-remittierende Multiple Sklerose
RT-PCR	reverse-Transkriptase-PCR
S1P1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1
SCID	schwere kombinierte Immundefizienz
SD	Standardabweichung
s. o.	siehe oben
SP	einfach-positiv
SSC	side scatter
TC	T-Zellen

TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMC	Thymische Myoidzellen
TNF	tumor necrosis factor
TRA	tissue-restricted antigens
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TRPC3	transient receptor potential canonical type-3
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	variable (gene)
w	weiblich

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aarli JA, Stefansson K, Marton LS, Wollmann RL. Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin. *Clin Exp Immunol*. 1990; 82:284-288.

Abdou NI, Lisak RP, Zweiman B, Abrahamsohn I, Penn AS. The thymus in myasthenia gravis. Evidence for altered cell populations. *N Engl J Med*. 1974; 291: 1271-1275.

Ahlberg R, Yi Q, Pirskanen R, Matell G, Swerup C, Rieber EP, Riethmüller G, Holm G, Lefvert AK. Treatment of myasthenia gravis with anti-CD4 antibody: improvement correlates to decreased T-cell autoreactivity. *Neurology*. 1994; 44: 1732-1737.

Anaya JM. Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology). *Autoimmun Rev*. 2012; 11: 781-784.

Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14: 73-99.

Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*. 2005; 23: 227-239.

Antozzi C, Gemma M, Regi B, Berta E, Confalonieri P, Peluchetti D, Mantegazza R, Baggi F, Marconi M, Fiacchino F, et al. A short plasma exchange protocol is effective in severe myasthenia gravis. *J Neurol*. 1991; 238: 103-107.

Arens R, Tesselaar K, Baars PA, van Schijndel GM, Hendriks J, Pals ST, Krimpenfort P, Borst J, van Oers MH, van Lier RA. Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN γ -mediated B cell depletion. *Immunity*. 2001; 15: 801-812.

Aricha R, Feferman T, Berrih-Aknin S, Fuchs S, Souroujon MC. Experimental myasthenia gravis in Aire-deficient mice: a link between Aire and regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1275: 107-113.

Aricha R, Feferman T, Fuchs S, Souroujon MC. Ex vivo generated regulatory T cells modulate experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*. 2008; 180: 2132-2139.

Aricha R, Mizrachi K, Fuchs S, Souroujon MC. Blocking of IL-6 suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2011; 36: 135-141.

Askmark H, Haggård L, Nygren I, Punga AR. Vitamin D deficiency in patients with myasthenia gravis and improvement of fatigue after supplementation of vitamin D3: a pilot study. *Eur J Neurol*. 2012; 19: 1554-1560.

Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: 227-235.

Balandina A, Lécart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*. 2005; 105: 735-741.

Balasa B, Deng C, Lee J, Bradley LM, Dalton DK, Christadoss P, Sarvetnick N. Interferon gamma (IFN-gamma) is necessary for the genesis of acetylcholine receptor-induced clinical experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *J Exp Med*. 1997; 186: 385-391.

Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*. 2002; 109 Suppl: S45-55.

Bernasconi P, Barberis M, Baggi F, Passerini L, Cannone M, Arnoldi E, Novellino L, Cornelio F, Mantegazza R. Increased toll-like receptor 4 expression in thymus of myasthenic patients with thymitis and thymic involution. *Am J Pathol*. 2005; 167: 129-139.

Berrih-Aknin S, Cohen-Kaminsky S, Lepage V, Neumann D, Bach JF, Fuchs S. T-cell antigenic sites involved in myasthenia gravis: correlations with antibody titre and disease severity. *J Autoimmun*. 1991; 4: 137-153.

Berrih-Aknin S, Morel E, Raimond F, Safar D, Gaud C, Binet JP, Levasseur P, Bach JF. The role of the thymus in myasthenia gravis: immunohistological and immunological studies in 115 cases. *Ann N Y Acad Sci*. 1987; 505: 50-70.

Berrih-Aknin S, Ragheb S, Le Panse R, Lisak RP. Ectopic germinal centers, BAFF and anti-B-cell therapy in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2013; 12: 885-893.

Berrih-Aknin S, Ruhlmann N, Bismuth J, Cizeron-Clairac G, Zelman E, Shachar I, Darteville P, de Rosbo NK, Le Panse R. CCL21 overexpressed on lymphatic vessels drives thymic hyperplasia in myasthenia. *Ann Neurol*. 2009; 66: 521-531.

Berrih S, Safar D, Levasseur P, Gaud C, Bach JF. The in vivo effects of corticosteroids on thymocyte subsets in myasthenia gravis. *J Clin Immunol*. 1984; 4: 92-97.

Bieganowska KD, Ausubel LJ, Modabber Y, Slovik E, Messersmith W, Hafler DA. Direct ex vivo analysis of activated, Fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease. *J Exp Med*. 1997; 185: 1585-1594.

Blum S, Gillis D, Brown H, Boyle R, Henderson R, Heyworth-Smith D, Hogan P, Kubler P, Lander C, Limberg N, Pillans P, Prain K, Staples C, Walsh M, McCombe P, Wong R. Use and monitoring of low dose rituximab in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011; 82: 659-663.

Bromberg MB, Carter O. Corticosteroid use in the treatment of neuromuscular disorders: empirical and evidence-based data. *Muscle Nerve*. 2004; 30: 20-37.

Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett*. 2011; 585: 3689-3698.

Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med*. 1998; 187: 1395-1402.

Cavalcante P, Bernasconi P, Mantegazza R. Autoimmune mechanisms in myasthenia gravis. *Curr Opin Neurol*. 2012; 25: 621-629.

Cavalcante P, Cufi P, Mantegazza R, Berrih-Aknin S, Bernasconi P, Le Panse R. Etiology of myasthenia gravis: innate immunity signature in pathological thymus. *Autoimmun Rev*. 2013; 12: 863-874.

Chaudhry V, Cornblath DR, Griffin JW, O'Brien R, Drachman DB. Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases. *Neurology*. 2001; 56: 94-96.

Ciafaloni E, Massey JM, Tucker-Lipscomb B, Sanders DB. Ciafaloni E, Massey JM, Tucker-Lipscomb B, Sanders DB. *Neurology*. 2001; 56: 97-99.

Cohen NR, Garg S, Brenner MB. Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv Immunol*. 2009; 102: 1-94.

Compston DA, Vincent A, Newsom-Davis J, Batchelor JR. Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain*. 1980; 103: 579-601.

Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2006; 116: 2843-2854.

Cosi V, Citterio A, Lombardi M, Piccolo G, Romani A, Erbetta A. Effectiveness of steroid treatment in myasthenia gravis: a retrospective study. *Acta Neurol Scand*. 1991; 84: 33-39.

Craston R, Koh M, Mc Dermott A, Ray N, Prentice HG, Lowdell MW. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. *J Immunol Methods*. 1997; 209: 37-45.

Cufi P, Dragin N, Weiss JM, Martinez-Martinez P, De Baets MH, Roussin R, Fadel E, Berrih-Aknin S, Le Panse R. Implication of double-stranded RNA signaling in the etiology of autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2013; 73: 281-293.

Curnow J, Corlett L, Willcox N, Vincent A. Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response. *J Neuroimmunol*. 2001; 115: 127-134.

Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 127-159.

Damjanović M, Vidić-Danković B, Kosec D, Isaković K. Thymus changes in experimentally induced myasthenia gravis. *Autoimmunity*. 1993; 15: 201-207.

Dau PC. Response to plasmapheresis and immunosuppressive drug therapy in sixty myasthenia gravis patients. *Ann N Y Acad Sci*. 1981; 377: 700-708.

Davis MM. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu Rev Biochem*. 1990; 59: 475-496.

De Feo LG, Schottlender J, Martelli NA, Molfino NA. Use of intravenous pulsed cyclophosphamide in severe, generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2002; 26: 31-36.

De Martino L, Capalbo D, Improda N, D'Elia F, Di Mase R, D'Assante R, D'Acunzo I, Pignata C, Salerno M. APECED: A Paradigm of Complex Interactions between Genetic Background and Susceptibility Factors. *Front Immunol*. 2013; 4: 331.

Djabiri F, Caillat-Zucman S, Gajdos P, Jaïs JP, Gomez L, Khalil I, Charron D, Bach JF, Garchon HJ. Association of the AChR α -subunit gene (CHRNA), DQA1*0101, and the DR3 haplotype in myasthenia gravis. Evidence for a three-gene disease model in a subgroup of patients. *J Autoimmun*. 1997; 10: 407-413.

Drachman DB, Jones RJ, Brodsky RA. Treatment of refractory myasthenia: "rebooting" with high-dose cyclophosphamide. *Ann Neurol*. 2003; 53: 29-34.

Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med*. 1994; 330: 1797-1810.

Dürkop H, Anagnostopoulos I, Bulfone-Paus S, Stein H. Expression of several members of the TNF-ligand and receptor family on tonsillar lymphoid B cells. *Br J Haematol*. 1997; 98: 863-868.

Durelli L, Massazza U, Poccardi G, Ferrio MF, Cavallo R, Maggi G, Casadio C, Di Summa M, Bergamini L. Increased thymocyte differentiation in myasthenia gravis: a dual-color immunofluorescence phenotypic analysis. *Ann Neurol*. 1990; 27:174-180.

Engel AG, Lambert EH, Howard FM. Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin Proc*. 1977; 52: 267-280.

Eng H, Lefvert AK, Mellstedt H, Osterborg A. Human monoclonal immunoglobulins that bind the human acetylcholine receptor. *Eur J Immunol*. 1987; 17: 1867-1869.

Evoli A, Batocchi AP, Palmisani MT, Lo Monaco M, Tonali P. Long-term results of corticosteroid therapy in patients with myasthenia gravis. *Eur Neurol*. 1992; 32: 37-43.

Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A, Ciaraffa F, Scambia G, Evoli A. Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment. *Immunology*. 2005; 116: 134-141.

Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A, Minicuci G, Riso R, Peri L, Scambia G, Evoli A. Thymopoiesis, regulatory T cells, and TCRV β expression in thymoma with and without myasthenia gravis, and modulatory effects of steroid therapy. *J Clin Immunol*. 2008; 28: 194-206.

Feng C, Woodside KJ, Vance BA, El-Khoury D, Canelles M, Lee J, Gress R, Fowlkes BJ, Shores EW, Love PE. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int Immunol*. 2002; 14: 535-544.

Ferraro A, Socci C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, Nano R, Olek S, Maffi P, Scavini M, Secchi A, Staudacher C, Bonifacio E, Battaglia M. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60: 2903-2913.

Fleischmann R, Kremer J, Cush J, Schulze-Koops H, Connell CA, Bradley JD, Gruben D, Wallenstein GV, Zwillich SH, Kanik KS; ORAL Solo Investigators. Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2012; 367: 495-507.

- Flores KG, Li J, Sempowski GD, Haynes BF, Hale LP. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1031-1039.
- Flynn JM, Byrd JC. Campath-1H monoclonal antibody therapy. *Curr Opin Oncol.* 2000; 12: 574-581.
- Fujii Y, Hashimoto J, Monden Y, Ito T, Nakahara K, Kawashima Y. Specific activation of lymphocytes against acetylcholine receptor in the thymus in myasthenia gravis. *J Immunol.* 1986; 136: 887-891.
- Fujii Y, Hayakawa M, Nakahara K. Thymus cells in myasthenia gravis: a two-colour flow cytometric analysis of lymphocytes in the thymus and thymoma. *J Neurol.* 1992; 239: 82-88.
- Fujii Y, Lindstrom J. Regulation of antibody production by helper T cell clones in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol.* 1988; 141: 3361-3369.
- Gajdos P, Chevret S, Clair B, Tranchant C, Chastang C. Clinical trial of plasma exchange and high-dose intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Clinical Study Group. *Ann Neurol.* 1997; 41: 789-796.
- Gambuzza M, Licata N, Palella E, Celi D, Foti Cuzzola V, Italiano D, Marino S, Bramanti P. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics for multiple sclerosis management. *J Neuroimmunol.* 2011; 239: 1-12.
- Genkins G, Sivak M, Tartter PI. Treatment strategies in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 681: 603-608.
- Gigliotti D, Lefvert AK, Jeddi-Tehrani M, Esin S, Hodara V, Pirskanen R, Wigzell H, Andersson R. Overexpression of select T cell receptor V beta gene families within CD4+ and CD8+ T cell subsets of myasthenia gravis patients: a role for superantigen(s)? *Mol Med.* 1996; 2: 452-459.
- Giraud M, Vandiedonck C, Garchon HJ. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1132: 180-192.
- Gold R, Krenzer M, Klinker E, Mansouri B, Schneider-Gold C, Müllges W, Böck M, Toyka KV. Efficacy and safety of immunadsorption vs. plasmapheresis vs. combination of both for treatment of myasthenic crisis: Comparative retrospective study on 72 patients. *Neurology* 2008; 70: A427.
- Gomez AM, Vrolix K, Martínez-Martínez P, Molenaar PC, Phernambucq M, van der Esch E, Duimel H, Verheyen F, Voll RE, Manz RA, De Baets MH, Losen M. Proteasome inhibition with bortezomib depletes plasma cells and autoantibodies in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol.* 2011; 186: 2503-2513.
- Green NM, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. *Semin Immunol.* 2011; 23: 106-112.

Gregersen PK, Kosoy R, Lee AT, Lamb J, Sussman J, McKee D, Simpfendorfer KR, Pirskanen-Matell R, Piehl F, Pan-Hammarstrom Q, Verschuuren JJ, Titulaer MJ, Niks EH, Marx A, Ströbel P, Tackenberg B, Pütz M, Maniaol A, Elsaïs A, Tallaksen C, Harbo HF, Lie BA, Raychaudhuri S, de Bakker PI, Melms A, Garchon HJ, Willcox N, Hammarstrom L, Seldin MF. Risk for myasthenia gravis maps to a (151) Pro→Ala change in TNIP1 and to human leukocyte antigen-B*08. *Ann Neurol*. 2012; 72: 927-935.

Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2000; 55: 7-15.

Grunewald J, Ahlberg R, Lefvert AK, DerSimonian H, Wigzell H, Janson CH. Abnormal T-cell expansion and V-gene usage in myasthenia gravis patients. *Scand J Immunol*. 1991; 34: 161-168.

Gu D, Wogensén L, Calcutt NA, Xia C, Zhu S, Merlie JP, Fox HS, Lindstrom J, Powell HC, Sarvetnick N. Myasthenia gravis-like syndrome induced by expression of interferon gamma in the neuromuscular junction. *J Exp Med*. 1995; 181: 547-557.

Hackl D, Loschko J, Sparwasser T, Reindl W, Krug AB. Activation of dendritic cells via TLR7 reduces Foxp3 expression and suppressive function in induced Tregs. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 1334-1343.

Harcourt GC, Sommer N, Rothbard J, Willcox HN, Newsom-Davis J. A juxta-membrane epitope on the human acetylcholine receptor recognized by T cells in myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 1988; 82: 1295-1300.

Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G. CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thymocyte positive selection. *J Immunol*. 1999; 162: 3978-3983.

Hart IK, Sathasivam S, Sharshar T. Immunosuppressive agents for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007; (4): CD005224.

Hawke S, Matsuo H, Nicolle M, Malcherek G, Melms A, Willcox N. Autoimmune T cells in myasthenia gravis: heterogeneity and potential for specific immunotargeting. *Immunol Today*. 1996; 17: 307-311.

Heckmann JM, Rawoot A, Bateman K, Renison R, Badri M. A single-blinded trial of methotrexate versus azathioprine as steroid-sparing agents in generalized myasthenia gravis. *BMC Neurol*. 2011; 11: 97.

Hemmer B, Jacobsen M, Sommer N. Degeneracy in T-cell antigen recognition - implications for the pathogenesis of autoimmune diseases. *J Neuroimmunol*. 2000; 107: 148-153.

Hemmer B, Vergelli M, Pinilla C, Houghten R, Martin R. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol Today*. 1998; 19: 163-168.

Henson SM, Riddell NE, Akbar AN. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24: 476-481.

- Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2011; 69: 418-422.
- Hill M, Beeson D, Moss P, Jacobson L, Bond A, Corlett L, Newsom-Davis J, Vincent A, Willcox N. Early-onset myasthenia gravis: a recurring T-cell epitope in the adult-specific acetylcholine receptor epsilon subunit presented by the susceptibility allele HLA-DR52a. *Ann Neurol*. 1999; 45: 224-231.
- Hill ME, Shiono H, Newsom-Davis J, Willcox N. The myasthenia gravis thymus: a rare source of human autoantibody-secreting plasma cells for testing potential therapeutics. *J Neuroimmunol*. 2008; 201-202: 50-56.
- Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, van Lier RA. CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol Today*. 1994; 15: 307-311.
- Hjelmström P, Giscombe R, Lefvert AK, Grünewald J, Pirskanen R, Sanjeevi CB. HLA-DQ associations and T-cell receptor V-gene usage in peripheral blood of Swedish myasthenia gravis patients. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24: 179-189.
- Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Autoantibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*. 2001; 7: 365-368.
- Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005; 433: 523-527.
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004; 5: 971-974.
- Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 772-782.
- Hohlfeld R, Toyka KV, Heininger K, Grosse-Wilde H, Kalies I. Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. *Nature*. 1984; 310: 244-246.
- Huang YM, Pirskanen R, Giscombe R, Link H, Lefvert AK. Circulating CD4+CD25+ and CD4+CD25+ T cells in myasthenia gravis and in relation to thymectomy. *Scand J Immunol*. 2004; 59: 408-414.
- Hurst J, von Landenberg P. Toll-like receptors and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008; 7: 204-208.
- Ichikawa Y, Shimizu H, Yoshida M, Arimori S. Two-color flow cytometric analysis of thymic lymphocytes from patients with myasthenia gravis and/or thymoma. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992; 62: 91-96.
- Infante AJ, Baillargeon J, Kraig E, Lott L, Jackson C, Hämmerling GJ, Raju R, David C. Evidence of a diverse T cell receptor repertoire for acetylcholine receptor, the autoantigen of myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2003; 21: 167-174.
- Ishikawa C, Kawakami H, Uchihara JN, Senba M, Mori N. CD69 overexpression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivation. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833: 1542-1552.

Jamieson BD, Douek DC, Killian S, Hultin LE, Scripture-Adams DD, Giorgi JV, Marelli D, Koup RA, Zack JA. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity*. 1999; 10: 569-575.

Jani-Acsadi A, Lisak RP. Myasthenic crisis: guidelines for prevention and treatment. *J Neurol Sci*. 2007; 261: 127-133.

Kadota Y, Okumura M, Miyoshi S, Kitagawa-Sakakida S, Inoue M, Shiono H, Maeda Y, Kinoshita T, Shirakura R, Matsuda H. Altered T cell development in human thymoma is related to impairment of MHC class II transactivator expression induced by interferon-gamma (IFN-gamma). *Clin Exp Immunol*. 2000; 121: 59-68.

Kao I, Drachman DB. Thymic muscle cells bear acetylcholine receptors: possible relation to myasthenia gravis. *Science*. 1977; 195: 74-75.

Kaul R, Shenoy M, Goluszko E, Christadoss P. Major histocompatibility complex class II gene disruption prevents experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*. 1994; 152: 3152-3157.

Kirchner T, Schalke B, Melms A, von Kügelgen T, Müller-Hermelink HK. Immunohistological patterns of non-neoplastic changes in the thymus in Myasthenia gravis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1986; 52: 237-257.

Kleczynska W, Jakiela B, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, Musial J. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011; 49: 646-653.

Kornstein MJ, Brooks JJ, Anderson AO, Levinson AI, Lisak RP, Zweiman B. The immunohistology of the thymus in myasthenia gravis. *Am J Pathol*. 1984; 117: 184-194.

Kosec D, Vidić-Danković B, Isaković K, Leposavić G. Alterations in the thymopoiesis in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Int J Neurosci*. 2005; 115: 461-477.

Lefvert AK, Bergström K, Matell G, Osterman PO, Pirskanen R. Determination of acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: clinical usefulness and pathogenetic implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1978; 41: 394-403.

Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med*. 1998; 187: 655-660.

Leite MI, Jones M, Ströbel P, Marx A, Gold R, Niks E, Verschuuren JJ, Berrih-Aknin S, Scaravilli F, Canelhas A, Morgan BP, Vincent A, Willcox N. Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol*. 2007; 171: 893-905.

Lennon VA, Lambert EH, Leiby KR, Okarma TB, Talib S. Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*. 1991; 146: 2245-2248.

Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J Exp Med*. 1975; 141: 1365-1375.

- Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, Braun D, Banerjee S. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1190-1199.
- Le Panse R, Cizeron-Clairac G, Cuvelier M, Truffault F, Bismuth J, Nancy P, De Rosbo NK, Berrih-Aknin S. Regulatory and pathogenic mechanisms in human autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1132: 135-142.
- Lien E, Zipris D. The role of Toll-like receptor pathways in the mechanism of type 1 diabetes. *Curr Mol Med*. 2009; 9: 52-68.
- Limburg PC, The TH, Hummel-Tappel E, Oosterhuis HJ. Anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. Part 1. Relation to clinical parameters in 250 patients. *J Neurol Sci*. 1983; 58: 357-370.
- Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*. 1976; 26: 1054-1059.
- Link H, Xu ZY, Melms A, Kalbacher H, Sun JB, Wang ZY, Fredrikson S, Olsson T. The T-cell repertoire in myasthenia gravis involves multiple cholinergic receptor epitopes. *Scand J Immunol*. 1992; 36: 405-414.
- Liu R, La Cava A, Bai XF, Jee Y, Price M, Campagnolo DI, Christadoss P, Vollmer TL, Van Kaer L, Shi FD. Cooperation of invariant NKT cells and CD4+CD25+ T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia. *J Immunol*. 2005; 175: 7898-7904.
- Liu YJ. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol*. 2009;101:1-25.
- Li X, Xiao BG, Xi JY, Lu CZ, Lu JH. Decrease of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells and elevation of CD19(+)BAFF-R(+) B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clin Immunol*. 2008; 126: 180-188.
- Luther C, Adamopoulou E, Stoeckle C, Brucklacher-Waldert V, Rosenkranz D, Stoltze L, Lauer S, Poeschel S, Melms A, Tolosa E. Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. *J Immunol*. 2009; 183: 841-848.
- MacLennan CA, Vincent A, Marx A, Willcox N, Gilhus NE, Newsom-Davis J, Beeson D. Preferential expression of AChR epsilon-subunit in thymomas from patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2008; 201-202: 28-32.
- Mantegazza R, Antozzi C, Peluchetti D, Sghirlanzoni A, Cornelio F. Azathioprine as a single drug or in combination with steroids in the treatment of myasthenia gravis. *J Neurol*. 1988; 235: 449-453.
- Mantegazza R, Baggi F, Bernasconi P, Antozzi C, Confalonieri P, Novellino L, Spinelli L, Ferrò MT, Beghi E, Cornelio F. Video-assisted thoracoscopic extended thymectomy and extended transsternal thymectomy (T-3b) in non-thymomatous myasthenia gravis patients: remission after 6 years of follow-up. *J Neurol Sci*. 2003; 212: 31-36.

- Marsh EA, Hirst CL, Llewelyn JG, Cossburn MD, Reilly MM, Krishnan A, Doran M, Ryan AM, Coles AJ, Jones JL, Robertson NP. Alemtuzumab in the treatment of IVIG-dependent chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol*. 2010; 257: 913-919.
- Marzio R, Mauël J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1999; 21: 565-582.
- Masuda M, Matsumoto M, Tanaka S, Nakajima K, Yamada N, Ido N, Ohtsuka T, Nishida M, Hirano T, Utsumi H. Clinical implication of peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol*. 2010; 225: 123-131.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004; 427: 355-360.
- Matsui N, Nakane S, Saito F, Ohigashi I, Nakagawa Y, Kurobe H, Takizawa H, Mitsui T, Kondo K, Kitagawa T, Takahama Y, Kaji R. Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis. *Neurology*. 2010; 74: 816-820.
- Matsumoto Y, Matsuo H, Sakuma H, Park IK, Tsukada Y, Kohyama K, Kondo T, Kotorii S, Shibuya N. CDR3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in myasthenia gravis. *J Immunol*. 2006; 176: 5100-5107.
- Maurer D, Holter W, Majdic O, Fischer GF, Knapp W. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1990; 20: 2679-2684.
- Meager A, Vincent A, Newsom-Davis J, Willcox N. Spontaneous neutralising antibodies to interferon-alpha and interleukin-12 in thymoma-associated autoimmune disease. *Lancet*. 1997; 350: 1596-1597.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001; 1: 135-145.
- Mehndiratta MM, Pandey S, Kuntzer T. Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 2: CD006986.
- Meinl E, Klinkert WE, Wekerle H. The thymus in myasthenia gravis. Changes typical for the human disease are absent in experimental autoimmune myasthenia gravis of the Lewis rat. *Am J Pathol*. 1991; 139: 995-1008.
- Melms A, Malcherek G, Gern U, Wiethölter H, Müller CA, Schoepfer R, Lindstrom J. T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the alpha-subunit. *Ann Neurol*. 1992; 31: 311-318.
- Melms A, Schalke BC, Kirchner T, Müller-Hermelink HK, Albert E, Wekerle H. Thymus in myasthenia gravis. Isolation of T-lymphocyte lines specific for the nicotinic acetylcholine receptor from thymuses of myasthenic patients. *J Clin Invest*. 1988; 81: 902-908.
- Meraouna A, Cizeron-Clairac G, Panse RL, Bismuth J, Truffault F, Tallaksen C, Berrih-Aknin S. The chemokine CXCL13 is a key molecule in autoimmune myasthenia gravis. *Blood*. 2006; 108: 432-440.

Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 475-490.

Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature.* 1992; 360: 264-265.

Miles K, Heaney J, Sibinska Z, Salter D, Savill J, Gray D, Gray M. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 887-892.

Moiola L, Protti MP, McCormick D, Howard JF, Conti-Tronconi BM. Myasthenia gravis. Residues of the alpha and gamma subunits of muscle acetylcholine receptor involved in formation of immunodominant CD4+ epitopes. *J Immunol.* 1994; 152: 4686-4698.

Mori T, Nomori H, Ikeda K, Kobayashi H, Iwatani K, Kobayashi T. The distribution of parenchyma, follicles, and lymphocyte subsets in thymus of patients with myasthenia gravis, with special reference to remission after thymectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 133: 364-368.

Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol.* 2012; 13: 121-128.

Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2004; 173: 4433-4442.

Muraro PA, Jacobsen M, Necker A, Nagle JW, Gaber R, Sommer N, Oertel WH, Martin R, Hemmer B. Rapid identification of local T cell expansion in inflammatory organ diseases by flow cytometric T cell receptor Vbeta analysis. *J Immunol Methods.* 2000; 246: 131-43.

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie, 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009.

Mygland A, Tysnes OB, Matre R, Volpe P, Aarli JA, Gilhus NE. Ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis patients with a thymoma. *Ann Neurol.* 1992; 32: 589-591.

Nagvekar N, Corlett L, Jacobson LW, Matsuo H, Chalkley R, Driscoll PC, Deshpande S, Spack EG, Willcox N. Scanning a DRB3*0101 (DR52a)-restricted epitope cross-presented by DR3: overlapping natural and artificial determinants in the human acetylcholine receptor. *J Immunol.* 1999; 162: 4079-4087.

Nancy P, Berrih-Aknin S. Differential estrogen receptor expression in autoimmune myasthenia gravis. *Endocrinology.* 2005; 146: 2345-2353.

Nath A, Kerman RH, Novak IS, Wolinsky JS. Immune studies in human immunodeficiency virus infection with myasthenia gravis: a case report. *Neurology.* 1990; 40: 581-583.

Navaneetham D, Penn AS, Howard JF Jr, Conti-Fine BM. TCR-Vbeta usage in the thymus and blood of myasthenia gravis patients. *J Autoimmun.* 1998; 11: 621-633.

- Newsom-Davis J. Therapy in myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Semin Neurol.* 2003; 23: 191-198.
- Nitschke M. Vergleichende Analyse der TCR-V β -Diversität und Reifungsstadien infanter und adulter menschlicher Thymozyten. Diss., Marburg 2009.
- Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wang LL. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2012; 32: 2731-2736.
- Nowak RJ, Dicapua DB, Zebardast N, Goldstein JM. Response of patients with refractory myasthenia gravis to rituximab: a retrospective study. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011; 4: 259-266.
- Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012; 11: A377-385.
- Okumura M, Ohta M, Takeuchi Y, Shiono H, Inoue M, Fukuhara K, Kadota Y, Miyoshi S, Fujii Y, Matsuda H. The immunologic role of thymectomy in the treatment of myasthenia gravis: implication of thymus-associated B-lymphocyte subset in reduction of the anti-acetylcholine receptor antibody titer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 126: 1922-1928.
- Olanow CW, Wechsler AS, Sirotkin-Roses M, Stajich J, Roses AD. Thymectomy as primary therapy in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 505: 595-606.
- Ong B, Willcox N, Wordsworth P, Beeson D, Vincent A, Altmann D, Lanchbury JS, Harcourt GC, Bell JI, Newsom-Davis J. Critical role for the Val/Gly86 HLA-DR beta dimorphism in autoantigen presentation to human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 7343-7347.
- Papadimitraki ED, Bertsias GK, Boumpas DT. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun.* 2007; 29: 310-318.
- Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, Aras G, Li J, Russell CB, Thompson EH, Baumgartner S. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med.* 2012; 366: 1181-1189.
- Pascuzzi RM, Coslett HB, Johns TR. Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients. *Ann Neurol.* 1984; 15: 291-298.
- Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science.* 1973; 180: 871-872.
- Perez MC, Buot WL, Mercado-Danguilan C, Bagabaldo ZG, Renales LD. Stable remissions in myasthenia gravis. *Neurology.* 1981; 31: 32-37.
- Pisetsky DS. The role of innate immunity in the induction of autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008; 8: 69-72.
- Poëa-Guyon S, Christadoss P, Le Panse R, Guyon T, De Baets M, Wakkach A, Bidault J, Tzartos S, Berrih-Aknin S. Effects of cytokines on acetylcholine receptor expression: implications for myasthenia gravis. *J Immunol.* 2005; 174: 5941-5949.

- Ponseti JM, Gamez J, Azem J, López-Cano M, Vilallonga R, Armengol M. Tacrolimus for myasthenia gravis: a clinical study of 212 patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1132: 254-263.
- Protti MP, Manfredi AA, Horton RM, Bellone M, Conti-Tronconi BM. Myasthenia gravis: recognition of a human autoantigen at the molecular level. *Immunol Today.* 1993; 14: 363-368.
- Protti MP, Manfredi AA, Straub C, Howard JF Jr, Conti-Tronconi BM. CD4+ T cell response to the human acetylcholine receptor alpha subunit in myasthenia gravis. A study with synthetic peptides. *J Immunol.* 1990a; 144: 1276-1281.
- Protti MP, Manfredi AA, Straub C, Wu XD, Howard JF Jr, Conti-Tronconi BM. Use of synthetic peptides to establish anti-human acetylcholine receptor CD4+ cell lines from myasthenia gravis patients. *J Immunol.* 1990b; 144: 1711-20.
- Res P, Blom B, Hori T, Weijer K, Spits H. Downregulation of CD1 marks acquisition of functional maturation of human thymocytes and defines a control point in late stages of human T cell development. *J Exp Med.* 1997; 185: 141-151.
- Res P, Spits H. Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol.* 1999; 11: 39-46.
- Roberts PF, Venuta F, Rendina E et al. Thymectomy in the treatment of ocular myasthenia gravis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 562–568.
- Roche JC, Capablo JL, Larrad L, Gervas-Arruga J, Ara JR, Sánchez A, Alarcia R. Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve.* 2011; 44: 278-280.
- Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy.* 2006; 36: 1357-1366.
- Rowin J, Meriggioli MN, Tüzün E, Leurgans S, Christadoss P. Etanercept treatment in corticosteroid-dependent myasthenia gravis. *Neurology.* 2004; 63: 2390-2392.
- Roxanis I, Micklem K, McConville J, Newsom-Davis J, Willcox N. Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis. *J Neuroimmunol.* 2002; 125: 185-197.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 490-500.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005; 6: 345-352.
- Salvetti M, Jung S, Chang SF, Will H, Schalke BC, Wekerle H. Acetylcholine receptor-specific T-lymphocyte clones in the normal human immune repertoire: target epitopes, HLA restriction, and membrane phenotypes. *Ann Neurol.* 1991; 29: 508-516.
- Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005; 26: 136-140.

Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, Niezychowski W; Study A3921063 Investigators. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2012; 367: 616-624.

Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, Bickham KL, Lerner H, Goldstein M, Sykes M, Kato T, Farber DL. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013; 38: 187-197.

Scarpino S, Di Napoli A, Stoppacciaro A, Antonelli M, Pillozzi E, Chiarle R, Palestro G, Marino M, Facciolo F, Rendina EA, Webster KE, Kinkel SA, Scott HS, Ruco L. Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol*. 2007; 149: 504-512.

Schluep M, Willcox N, Vincent A, Dhoot GK, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol*. 1987; 22: 212-222.

Schönbeck S, Padberg F, Hohlfeld R, Wekerle H. Transplantation of thymic autoimmune microenvironment to severe combined immunodeficiency mice. A new model of myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 1992; 90: 245-250.

Schumm F, Stohr M. Accessory nerve stimulation in the assessment of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1984; 7: 147–151.

Schumm F, Wiethölter H, Fateh-Moghadam A, Dichgans J. Thymectomy in myasthenia with pure ocular symptoms. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1985; 48: 332-337.

Serafini B, Cavalcante P, Bernasconi P, Aloisi F, Mantegazza R. Epstein-Barr virus in myasthenia gravis thymus: a matter of debate. *Ann Neurol*. 2011; 70: 519.

Sghirlanzoni A, Peluchetti D, Mantegazza R, Fiacchino F, Cornelio F. Myasthenia gravis: prolonged treatment with steroids. *Neurology*. 1984; 34: 170-174.

Sheng JR, Muthusamy T, Prabhakar BS, Meriggioli MN. GM-CSF-induced regulatory T cells selectively inhibit anti-acetylcholine receptor-specific immune responses in experimental myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2011; 240-241: 65-73.

Shi FD, Wang HB, Li H, Hong S, Taniguchi M, Link H, Van Kaer L, Ljunggren HG. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol*. 2000; 1: 245-251.

Shiow LR, Rosen DB, Brdicková N, Xu Y, An J, Lanier LL, Cyster JG, Matloubian M. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*. 2006; 440: 540-544.

Shotorbani SS, Su ZL, Xu HX. Toll-like receptors are potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *World J Biol Chem*. 2011; 2: 167-172.

Silk JD, Salio M, Brown J, Jones EY, Cerundolo V. Structural and functional aspects of lipid binding by CD1 molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008; 24: 369-395.

Skeie GO, Apostolski S, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, Harms L, Hilton-Jones D, Melms A, Verschuuren J, Horge HW; European Federation of Neurological Societies. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol*. 2010; 17: 893-902.

Sommer N, Harcourt GC, Willcox N, Beeson D, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. *Neurology*. 1991; 41: 1270-1276.

Sommer N, Tackenberg B, Hohlfeld R. The immunopathogenesis of myasthenia gravis. *Handb Clin Neurol*. 2008; 91: 169-212.

Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol*. 1986; 75: 43-88.

Ströbel P, Chuang WY, Chuvpilo S, Zettl A, Katzenberger T, Kalbacher H, Rieckmann P, Nix W, Schalke B, Gold R, Müller-Hermelink HK, Peterson P, Marx A. Common cellular and diverse genetic basis of thymoma-associated myasthenia gravis: role of MHC class II and AIRE genes and genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1132: 143-156.

Suzuki Y, Onodera H, Tago H, Saito R, Ohuchi M, Shimizu M, Itoyama Y. Altered populations of natural killer cell and natural killer T cell subclasses in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2005; 167: 186-189.

Tackenberg B, Kruth J, Bartholomaeus JE, Schlegel K, Oertel WH, Willcox N, Hemmer B, Sommer N. Clonal expansions of CD4+ B helper T cells in autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 849-863.

Tackenberg B, Schlegel K, Happel M, Eienbröker C, Gellert K, Oertel WH, Meager A, Willcox N, Sommer N. Expanded TCR Vbeta subsets of CD8(+) T-cells in late-onset myasthenia gravis: novel parallels with thymoma patients. *J Neuroimmunol*. 2009; 216: 85-91.

Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T, Kawakami Y, Kuwana M. T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2007; 127: 324-330.

Takamori M. Autoantibodies against TRPC3 and ryanodine receptor in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2008; 200: 142-144.

Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*. 1994; 15: 479-483.

Testi R, Phillips JH, Lanier LL. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol*. 1989; 142: 1854-1860.

Thangarajh M, Masterman T, Helgeland L, Rot U, Jonsson MV, Eide GE, Pirskanen R, Hillert J, Jonsson R. The thymus is a source of B-cell-survival factors-APRIL and BAFF-in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2006; 178: 161-166.

Thiruppathi M, Rowin J, Ganesh B, Sheng JR, Prabhakar BS, Meriggioli MN. Impaired regulatory function in circulating CD4(+)CD25(high)CD127(low/-) T cells in patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol*. 2012; 145: 209-223.

Tindall RS. Humoral immunity in myasthenia gravis: biochemical characterization of acquired antireceptor antibodies and clinical correlations. *Ann Neurol*. 1981; 10: 437-447.

Tindall RS, Phillips JT, Rollins JA, Wells L, Hall K. A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 681: 539-551.

Tindall RS, Rollins JA, Phillips JT, Greenlee RG, Wells L, Belendiuk G. Preliminary results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *N Engl J Med*. 1987; 316: 719-724.

Toyka KV, Brachman DB, Pestronk A, Kao I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science*. 1975; 190: 397-399.

Trigueros C, Ramiro AR, Carrasco YR, de Yebenes VG, Albar JP, Toribio ML. Identification of a late stage of small noncycling pTalpha- pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor alpha/beta+ thymocytes. *J Exp Med*. 1998; 188: 1401-1412.

Truffault F, Cohen-Kaminsky S, Khalil I, Levasseur P, Berrih-Aknin S. Altered intrathymic T-cell repertoire in human myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 1997; 41: 731-741.

Vandiedonck C, Giraud M, Garchon HJ. Genetics of autoimmune myasthenia gravis: the multifaceted contribution of the HLA complex. *J Autoimmun*. 2005; 25 Suppl: 6-11.

Vanhecke D, Leclercq G, Plum J, Vandekerckhove B. Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69+CD3+ thymocytes and identification of thymic emigrants. *J Immunol* 1995, 155: 1862-1972.

Van Lier RA, Borst J, Vroom TM, Klein H, Van Mourik P, Zeijlemaker WP, Melief CJ. Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. *J Immunol*. 1987; 139: 1589-1596.

Van Oosterwijk MF, Juwana H, Arens R, Tesselaar K, van Oers MH, Eldering E, van Lier RA. CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development. *Int Immunol*. 2007; 19: 713-718.

Van Vollenhoven RF, Fleischmann R, Cohen S, Lee EB, García Meijide JA, Wagner S, Forejtova S, Zwillich SH, Gruben D, Koncz T, Wallenstein GV, Krishnaswami S, Bradley JD, Wilkinson B; ORAL Standard Investigators. Tofacitinib or adalimumab versus placebo in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2012; 367: 508-519.

Vincent A. Aetiological factors in development of myasthenia gravis. *Adv Neuroimmunol*. 1994; 4: 355-371.

Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1985; 48: 1246-1252.

Vincent A, Scadding GK, Thomas HC, Newsom-Davis J. In-vitro synthesis of anti-acetylcholine-receptor antibody by thymic lymphocytes in myasthenia gravis. *Lancet*. 1978; 1: 305-307.

Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 797-804.

Wang HB, Shi FD, Li H, Chambers BJ, Link H, Ljunggren HG. Anti-CTLA-4 antibody treatment triggers determinant spreading and enhances murine myasthenia gravis. *J Immunol*. 2001; 166: 6430-6436.

Wang XB, Pirskanen R, Giscombe R, Lefvert AK. Two SNPs in the promoter region of the CTLA-4 gene affect binding of transcription factors and are associated with human myasthenia gravis. *J Intern Med*. 2008; 263: 61-69.

Wang YZ, Yan M, Tian FF, Zhang JM, Liu Q, Yang H, Zhou WB, Li J. Possible involvement of toll-like receptors in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Inflammation*. 2013; 36: 121-130.

Wang ZY, Karachunski PI, Howard JF Jr, Conti-Fine BM. Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4⁺ and CD8⁺ cells. *Neurology*. 1999; 52: 484-497.

Weinberg CB, Hall ZW. Antibodies from patients with myasthenia gravis recognize determinants unique to extrajunctional acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 504-508.

Weiss JM, Cufi P, Bismuth J, Eymard B, Fadel E, Berrih-Aknin S, Le Panse R. SDF-1/CXCL12 recruits B cells and antigen-presenting cells to the thymus of autoimmune myasthenia gravis patients. *Immunobiology*. 2013; 218: 373-381.

Wekerle TH, Paterson B, Ketelsen U, Feldman M. Striated muscle fibres differentiate in monolayer cultures of adult thymus reticulum. *Nature*. 1975; 256: 493-494.

Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag, München, 2006.

Wiendl H, Fuhr P, Gold R, Hohlfeld R, Melms A, Tackenberg B, Schneider-Gold C, Zimprich F. Diagnostik und Therapie der Myasthenia gravis und des Lambert-Eaton-Syndroms. In: Diener HC, Weimar C (Hrsg.): *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 2012.

Willcox HN, Newsom-Davis J, Calder LR. Cell types required for anti-acetylcholine receptor antibody synthesis by cultured thymocytes and blood lymphocytes in myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol*. 1984; 58: 97-106.

Wills MR, Carmichael AJ, Weekes MP, Mynard K, Okecha G, Hicks R, Sissons JG. Human virus-specific CD8⁺ CTL clones revert from CD45RO^{high} to CD45RA^{high} in vivo: CD45RA^{high}CD8⁺ T cells comprise both naive and memory cells. *J Immunol*. 1999; 162: 7080-7087.

Witte AS, Cornblath DR, Parry GJ, Lisak RP, Schatz NJ. Azathioprine in the treatment of myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 1984; 15: 602-605.

Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66: 2603-2622.

Wynn D, Kaufman M, Montalban X, Vollmer T, Simon J, Elkins J, O'Neill G, Neyer L, Sheridan J, Wang C, Fong A, Rose JW; CHOICE investigators. Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 381-390.

Xu BY, Giscombe R, Söderlund A, Troye-Blomberg M, Pirskanen R, Lefvert AK. Abnormal T cell receptor V gene usage in myasthenia gravis: prevalence and characterization of expanded T cell populations. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113: 456-464.

Yuen MH, Protti MP, Diethelm-Okita B, Moiola L, Howard JF Jr, Conti-Fine BM. Immunoregulatory CD8⁺ cells recognize antigen-activated CD4⁺ cells in myasthenia gravis patients and in healthy controls. *J Immunol.* 1995; 154: 1508-1520.

Zhang GX, Xiao BG, Bai XF, van der Meide PH, Orn A, Link H. Mice with IFN-gamma receptor deficiency are less susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol.* 1999; 162: 3775-3781.

Zhang Y, Wang HB, Chi LJ, Wang WZ. The role of FoxP3⁺CD4⁺CD25^{hi} Tregs in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Immunol Lett.* 2009; 122: 52-57.

8. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer in Marburg waren:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanffy, Bette, Bien, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Duda, Eggert, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Gerdes, Görg, Görg, Gotzen, Griss, Grzeschik, Grundmann, Gudermann, Herzum, Jungclas, Kerzel, Kill, Klose, Köhler, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Möller, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Rausch, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schmidt, Schmidt, Schrader, Schrader, Seitz, Sesterhenn, Sommer, Steiniger, Stiletto, Sure, Tackenberg, Trebst, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Weiler, Wennemuth, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf.

9. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Oertel für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes und der Infrastruktur.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Tackenberg, für die Überlassung des Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die konstruktiven Ratschläge während der Studiendurchführung und -auswertung.

Herzlich danke ich auch den Mitarbeitern der AG Klinische Neuroimmunologie, Frau K. Schlegel, Herrn M. Happel, Frau A. Hehenkamp und Frau I. Beaupain. Sie waren mir eine große Hilfe bei der Gewinnung der Blut- und Thymusproben sowie bei der durchflusszytometrischen Analyse.

Dankbar bin ich Herrn Dr. M. Pütz, der mir neben der Hilfe bei der FACS-Analyse eine große Unterstützung bei der wissenschaftlichen Auswertung der erhobenen Daten war.

Ich danke ebenso herzlich meinem Kollegen, Herrn F. Seitz, der mit seiner kollegialen Art und seinem freundschaftlichen Einsatz zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gellert und Herrn Dr. Martin aus Berlin, ohne deren kollegiale Unterstützung die Gewinnung eines solch großen Kollektivs von Thymusproben von MG-Patienten nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Moosdorf, Herrn Dr. Köster, Herrn Dr. Vanucchi, Herrn Dr. Rybinski, Herrn PD Dr. Mirow, Herrn Dr. Irsusi und Herrn Prof. Dr. Vogt danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Thymusproben der immunologisch gesunden Kontrollpersonen.

Besonderer Dank gilt allen Patienten und Kontrollpersonen, die an dieser Studie teilgenommen haben, und die bereit waren, Blut- und Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke zu spenden.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich bei dieser Arbeit wie auch in allen anderen Situationen meines Lebens unterstützt hat.

10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Die ehrenwörtliche Erklärung wurde der Arbeit vor Drucklegung entnommen.

11. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde der Arbeit vor Drucklegung entnommen.

12. ANHANG

12.1 Listen der Studienteilnehmer

12.1.1 MG-Patienten

	Geschlecht	Alter	MG-Subtyp	MGFA-Klasse	MGFA-Therapie-status	Histopathologischer Befund	Weitere Autoimmunerkrankungen
TMG 01	w	29	OMG	I	CH	LFH	-
TMG 02	m	21	EOMG	IIA	CH	LFH	-
TMG 03	w	22	EOMG	IIA	CH	LFH	-
TMG 04	w	29	EOMG	IIIA	CH, PR	LFH	Autoimmunhyperthyreose (M. Basedow)
TMG 08	w	25	EOMG	IIB	CH	LFH	Hashimoto-Thyreoiditis
TMG 13	w	40	OMG	I	CH	LFH	Hashimoto-Thyreoiditis
TMG 14	w	40	EOMG	IIA	CH	LFH	Autoimmunhyperthyreose (M. Basedow)
TMG 16	m	34	EOMG	IIB	CH, IM	LFH	-
TMG 18	w	22	EOMG	IIA	CH	LFH	-
TMG 20	w	44	EOMG	IIA	CH, PR, IM	Normalbefund	Sarkoidose, Hashimoto-Thyreoiditis
TMG 21	w	23	EOMG	IIB	CH, PR	LFH	-
TMG 22	w	49	OMG	I	CH, PR, IM	Involution	-
TMG 24	w	42	EOMG	IIA	CH	LFH	-
TMG 25	w	35	EOMG	IIA	CH, IM	LFH	-
TMG 26	w	22	EOMG	IIB	CH	LFH	-
TMG 27	w	29	EOMG	IIA	CH, PR	LFH	-
TMG 28	w	20	EOMG	IIB	CH, PR, IM	LFH	-
TMG 29	w	36	EOMG	IIA	CH	LFH	-
TMG 30	w	16	EOMG	IIA	CH, IM	LFH	-

	Geschlecht	Alter	MG-Subtyp	MGFA-Klasse	MGFA-Therapie-status	Histopathologischer Befund	Weitere Autoimmunerkrankungen
TMG 31	w	24	EOMG	IIA	CH, PR	LFH	-
TMG 32	w	27	EOMG	IIB	CH, IM	LFH	-
TMG 34	m	31	EOMG	IIA	CH, IM	LFH	-
TMG 35	m	42	EOMG	IIA	CH, PR, IM	Normalbefund	-
TMG 36	w	23	EOMG	IIA	CH, PR	LFH	Hashimoto-Thyreoiditis
TMG 37	w	21	EOMG	IVB	CH, PR, PE(a)	LFH	-
TMG 38	w	40	EOMG	IIIA	CH, PR, IG(c)	LFH	-
TMG 39	m	52	EOMG	IIA	CH, PR, IM	Normalbefund	-
TMG 40	w	11	EOMG	IIIA	CH	LFH	-
TMG 41	m	28	EOMG	IIA	CH, PR, IM	LFH	V.a. Colitis ulcerosa
TMG 42	w	21	OMG	I	CH	LFH	-
TMG 43	w	30	EOMG	IIA	CH	LFH	-
TMG 44	m	43	EOMG	IIA	CH, IM	Involution	-
TMG 45	w	19	EOMG	IIA	CH	LFH	Hashimoto-Thyreoiditis
TMG 51	w	35	EOMG	IIA	CH	LFH	Antiphospholipid-Syndrom
TMG 54	w	24	EOMG	IIB	CH	LFH	-
TMG 55	w	40	EOMG	IIA	CH, PR, IM	Involution	-
TMG 58	m	43	EOMG	IIA	CH, PR	LFH	-
TMG 60	w	29	EOMG	IIA	CH	LFH	-
TMG 61	w	23	EOMG	IIB	CH, PR	Normalbefund	-
TMG 62	w	27	EOMG	IIB	CH, PR	LFH	-

Klinische Charakteristika der MG-Patienten. NT: keine Therapie, CH: Pyridostigmin, PR: Prednison, Prednisolon oder Methylprednisolon, IM: Immunsuppressivum (hier jeweils Azathioprin), Ig(c): regelmäßige Applikation von intravenösen Immunglobulinen, PE(a): Plasmaseparationen zur Behandlung einer akuten Verschlechterung, LFH: lymphofollikuläre Hyperplasie.

12.1.2 Kontrollpersonen

	Geschlecht	Alter	Indikation zum kardiochirurgischen Eingriff
Tn 63	w	82	Kombiniertes Aortenklappenvitium
Tn 64	m	67	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 67	m	57	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 68	m	57	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 69	m	69	Aortenklappenstenose, KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 71	m	68	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 72	m	62	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 73	m	33	Aortenklappeninsuffizienz
Tn 74	m	57	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 75	m	44	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 76	m	55	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 77	m	32	Aortenaneurysma
Tn 78	m	59	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 79	m	43	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 80	w	58	Aortenklappenstenose
Tn 81	m	49	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 82	m	61	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 83	w	52	Aortenaneurysma, Aortenklappeninsuffizienz
Tn 84	m	49	Aortenaneurysma
Tn 85	m	57	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 86	m	60	KHK, aortocoronarer Bypass
Tn 87	m	43	Mitralklappeninsuffizienz

Klinische Charakteristika der Kontrollpersonen. KHK: Koronare Herzkrankheit.

12.2 Verwendete Materialien und Geräte

Name	Zusammensetzung / Wirkstoffe / Sonstiges	Hersteller	Ort	Land
Materialien				
PP-Test tubes 50 ml	Steril	Greiner	Frickenhausen	Deutschland
Petrischalen	Steril	Nunc	Wiesbaden	Deutschland
PS-Mikro-Platten; 96 wells	Rundboden	Greiner	Frickenhausen	Deutschland
Pipetten	Verschiedene	Eppendorff	Hamburg	Deutschland
Pipettenspitzen	Blau und Gelb	Greiner	Frickenhausen	Deutschland
Kryotubes		Nunc	Wiesbaden	Deutschland
S-Monovetten 9ml KE		Sarstest	Nurnbrecht	Deutschland
Falkon®-Röhrchen 5 ml		Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland
Stahlsiebe		Diverse		
Einmalspitzenstempel		Braun	Melsungen	Deutschland
Nalgene®	Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International	Rochester	USA
500 ml Filtersystem 2µl		Corning	New York	USA
Fuchs-Rosenthal-Zählkammern		Neubauer	Mariefeld	Deutschland
Geräte				
Megafuge® 1.0R		Heraeus Instruments	Hanau	Deutschland
Mikroskop		Hund	Wetzlar	Deutschland
FacsCalibur		Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland
EDV				
CellQuest® 1996		Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland
G3 Power PC		Apple	Cupertino	USA
Graph Pad Prism 6		Graph Pad Software Inc.	La Jolla	USA
I-MAC®		Apple	Cupertino	USA
Microsoft Excel 2007®		Microsoft Corporation	Redmond	USA
Chemikalien und Lösungen				
RPMI-1640 Medium		Sigma	Taufkirchen	Deutschland
NEM Non-Essential-Amino-Acid-Solution		Sigma	Taufkirchen	Deutschland
Sodium Pyruvate		Sigma	Taufkirchen	Deutschland
Hepes Buffer	1 M	Sigma	Taufkirchen	Deutschland
Penicillin/Streptomycin		Gibco/Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
L-Glutamin	200 MM	Gibco/Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Humanserum		Sigma	Taufkirchen	Deutschland
Mercaptoethanol		Roth	Karlsruhe	Deutschland
DNase in NaCl-Tris-Puffer		Boehringer	Ingelheim	Deutschland
Trypan Blue Stain 0,4%		Gibco/Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
DMSO Hybri-Max®	Dimethylsulfoxid	Sigma	Steinkirchen	Deutschland
PharM Lyse®	Ammoniumchlorid	PharMingen/Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland
PBS® Dulbecco's		Gibco/Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Fetal Bovine Serum		Gibco/Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Aqua ad iniectabila		Braun	Melsungen	Deutschland
Ficoll Separating solution		Biochrom KG	Berlin	Deutschland

Name	Zusammensetzung / Wirkstoffe / Sonstiges	Hersteller	Ort	Land
Cell-Wash		Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland

12.3 Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Klon	Ig Subtyp ¹	Hersteller ²
T-Zell-Marker				
CD4	APC	RPA-T4	IgG1	BD
CD8	FITC, PerCP	SK1	IgG1	BD
CD3	FITC, PerCP	SK7	IgG1	BD
TCR α/β	PE	BMA031	IgG2b	BC
TCR γ/δ	FITC	IMMU 510	IgG1	BC
T-Zell-Rezeptor Vβ-Ketten-Marker				
Vβ 1	PE, FITC	BL37.2	IgG1, rat	BC
Vβ 2	PE	MPB2D5	IgG1	BC
Vβ 3	PE	CH92	IgM	BC
Vβ 5.1	PE, FITC	IMMU 157	IgG2a	BC
Vβ 5.2	PE, FITC	36213	IgG1	BC
Vβ 5.3	PE	3D11	IgG1	BC
Vβ 7	PE	ZOE	IgG2a	BC
Vβ 8	PE, FITC	56C5.2	IgG2a	BC
Vβ 9	PE	FIN9	IgG2a	BC
Vβ 11	PE, FITC	C21	IgG2a	BC
Vβ 12	PE	VER2.32.1	IgG2a	BC
Vβ 13.1	PE	IMMU 222	IgG2b	BC
Vβ 13.6	PE, FITC	JU74.3	IgG1	BC
Vβ 14	PE	CAS1.1.3	IgG1	BC
Vβ 16	PE, FITC	TAMAYA1.2	IgG1	BC
Vβ 17	PE, FITC	E17.5F3.15.13	IgG1	BC
Vβ 18	PE	BA62.6	IgG1	BC
Vβ 20	PE	ELL1.4	IgG	BC
Vβ 21.3	PE, FITC	IG125	IgG2a	BC
Vβ 22	FITC	IMMU 546	IgG1	BC
Vβ 23	PE	AF23	IgG1	BC
Thymozyten-Reifungsmarker				
CD1a	PE	BL6	IgG1	BC
CD1a	FITC	HI149	IgG1	BD
CD69	PE	TP1.55.3	IgG2b	BC
CD69	FITC	FN50	IgG1	BD
CD45RO	PE, FITC, APC	UCHL 1	IgG2a	BC
CD45RA	FITC	HI 100	IgG2b	BD
CD27	PE	M-T271	IgG1	BD

¹: Mausantikörper, sofern nicht anders gekennzeichnet. ²: Hersteller: BC = Beckmann Coulter, Inc., Fullerton, CA, U.S.A.; www.coulter.com; BD = BD, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.; www.bd.com; ST= Serotec Inc., Raleigh, NC, U.S.A.; www.serotec-inc.com.

12.4 Färbungen Blut

	PE	FITC	PerCP	APC
	R-Phycoerythrin	Fluorescein	Peridin-Chlorophyll-a	Allophycocyanin
	Anregung bei 488 nm	Anregung bei 495 nm	Anregung bei 470 nm	Anregung bei 650 nm
	Emission bei 578 nm	Emission bei 525 nm	Emission bei 680 nm	Emission bei 660 nm
1.	Vβ 2	Vβ 1	CD8	CD4
2.	Vβ 3	Vβ 5.1	CD8	CD4
3.	Vβ 5.3	Vβ 5.2	CD8	CD4
4.	Vβ 7	PBS	CD8	CD4
5.	Vβ 9	Vβ 8	CD8	CD4
6.	Vβ 12	Vβ 11	CD8	CD4
7.	Vβ 13.1	Vβ 13.6	CD8	CD4
8.	Vβ 14	Vβ 16	CD8	CD4
9.	Vβ 18	Vβ 17	CD8	CD4
10.	Vβ 20	Vβ 21.3	CD8	CD4
11.	Vβ 23	Vβ 22	CD8	CD4

12.5 Färbungen Thymus

12.5.1 CD1a und V β -Ketten

	PE	FITC	PerCP	APC
	R-Phycoerythrin	Fluorescein	Peridin-Chlorophyll-a	Allophycocyanin
	Anregung bei 488 nm	Anregung bei 495 nm	Anregung bei 470 nm	Anregung bei 650 nm
	Emission bei 578 nm	Emission bei 525 nm	Emission bei 680 nm	Emission bei 660 nm
1.	V β 1	CD1a	CD8	CD4
2.	V β 2	CD1a	CD8	CD4
3.	V β 3	CD1a	CD8	CD4
4.	V β 5.1	CD1a	CD8	CD4
5.	V β 5.2	CD1a	CD8	CD4
6.	V β 5.3	CD1a	CD8	CD4
7.	V β 7	CD1a	CD8	CD4
8.	V β 8	CD1a	CD8	CD4
9.	V β 9	CD1a	CD8	CD4
10.	V β 11	CD1a	CD8	CD4
11.	V β 12	CD1a	CD8	CD4
12.	V β 13.1	CD1a	CD8	CD4
13.	V β 13.6	CD1a	CD8	CD4
14.	V β 14	CD1a	CD8	CD4
15.	V β 16	CD1a	CD8	CD4
16.	V β 17	CD1a	CD8	CD4
17.	V β 18	CD1a	CD8	CD4
18.	V β 20	CD1a	CD8	CD4
19.	V β 21.3	CD1a	CD8	CD4
20.	V β 22	CD1a	CD8	CD4
21.	V β 23	CD1a	CD8	CD4
22.	TCR α/β	TCR γ/δ	CD8	CD4

12.5.2 CD69 und V β -Ketten

	PE	FITC	PerCP	APC
	R-Phycoerythrin	Fluorescein	Peridin-Chlorophyll-a	Allophycocyanin
	Anregung bei 488 nm	Anregung bei 495 nm	Anregung bei 470 nm	Anregung bei 650 nm
	Emission bei 578 nm	Emission bei 525 nm	Emission bei 680 nm	Emission bei 660 nm
1.	V β 1	CD69	CD8	CD4
2.	V β 2	CD69	CD8	CD4
3.	V β 3	CD69	CD8	CD4
4.	V β 5.1	CD69	CD8	CD4
5.	V β 5.2	CD69	CD8	CD4
6.	V β 5.3	CD69	CD8	CD4
7.	V β 7	CD69	CD8	CD4
8.	V β 8	CD69	CD8	CD4
9.	V β 9	CD69	CD8	CD4
10.	V β 11	CD69	CD8	CD4
11.	V β 12	CD69	CD8	CD4
12.	V β 13.1	CD69	CD8	CD4
13.	V β 13.6	CD69	CD8	CD4
14.	V β 14	CD69	CD8	CD4
15.	V β 16	CD69	CD8	CD4
16.	V β 17	CD69	CD8	CD4
17.	V β 18	CD69	CD8	CD4
18.	V β 20	CD69	CD8	CD4
19.	V β 21.3	CD69	CD8	CD4
20.	V β 22	CD69	CD8	CD4
21.	V β 23	CD69	CD8	CD4

12.5.3 Subpopulationen

	PE	FITC	PerCP	APC
	R-Phycoerythrin	Fluorescein	Peridin-Chlorophyll-a	Allophycocyanin
	Anregung bei 488 nm	Anregung bei 495 nm	Anregung bei 470 nm	Anregung bei 650 nm
	Emission bei 578 nm	Emission bei 525 nm	Emission bei 680 nm	Emission bei 660 nm
1.	CD8	CD4	CD45RA	CD27
2.	CD8	CD4	CD69	CD27

12.6 Vβ-Ketten-Expansionen

	Thymus	PBL
TMG 04	16/2,0	-
TMG 16	7/2,2	7/2,8 12/6,7 16/2,2 18/3,7
TMG 20	-	5.1/4,4 5.3/3,9
TMG 21	-	5.3/10,6 13.1/2,1
TMG 22	-	5.1/5,0 5.3/2,6
TMG 25	-	5.1/2,8 5.3/8,8 14/2,6
TMG 27	-	5.1/3,2 5.2/2,6 5.3/12,8
TMG 28	7/2,9	5.1/3,6 5.3/6,8 12/3,9 13.1/2,0
TMG 30	entfällt	5.3/4,5
TMG 31	-	5.1/2,2 5.3/6,3
TMG 32	-	entfällt
TMG 34	-	5.3/10,5
TMG 35	12/3,4 13.1/3,1 18/2,2	5.1/3,2 5.3/7,9
TMG 36	12/3,6 13.1/2,4 18/3,0	5.3/9,4
TMG 37	-	1/8,1 5.3/10,3
TMG 38	7/2,4 13.1/2,1	5.1/2,1 5.3/9,0
TMG 39	7/2,4	5.3/3,9 16/4,0
TMG 41	13.1/2,0 18/2,0	5.3/2,0 12/3,3
TMG 44	5.1/3,0	1/3,7 12/2,0 13.1/3,8 16/4,6
TMG 55	-	-
TMG 58	13.1/2,8 22/6,2	22/2,9
TMG 61	-	entfällt
TMG 62	5.1/2,3 18/3,9	1/4,7 5.1/2,0 18/2,5

Vβ-Expansionen von CD4⁺-Zellen der immunsuppressiv behandelten MG-Pat. (Vβ-Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert bei Normalkontrollen (s. Tab. 4.2 und 4.3)).

	Thymus	PBL
TMG 04	13.1/2,4	16/9,8
TMG 16	-	-
TMG 20	-	5.1/5,9 5.2/4,4 7/2,0 22/3,0
TMG 21	5.2/2,6	5.2/3,7 5.3/2,8
TMG 22	5.3/2,1	5.1/3,3 5.2/2,3 5.3/10,1
TMG 25	-	5.2/3,4 5.3/3,4
TMG 27	-	5.3/3,7 7/2,8
TMG 28	7/3,0 13.1/2,6	5.2/4,7
TMG 30	entfällt	5.2/3,1
TMG 31	-	5.2/3,6
TMG 32	-	entfällt
TMG 34	13.1/2,3	5.1/2,8 5.2/4,3 5.3/3,2
TMG 35	13.1/2,0	5.2/3,4 5.3/3,2 13.1/2,7 17/2,2
TMG 36	13.1/2,0	5.2/2,8 16/2,2
TMG 37	-	5.1/2,5 5.2/4,5 5.3/2,8
TMG 38	7/2,4 13.1/2,2	5.1/3,3 5.2/5,0 5.3/2,2
TMG 39	-	1/3,2 5.1/2,6 5.3/2,5 8/2,7
TMG 41	13.1/2,3	8/3,1 13.6/2,3
TMG 44	12/2,8	3/2,2
TMG 55	13.6/4,5	22/3,5
TMG 58	-	-
TMG 61	-	entfällt
TMG 62	7/2,4	7/4,0

Vβ-Expansionen von CD8⁺-Zellen der immunsuppressiv behandelten MG-Pat. (Vβ-Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert bei Normalkontrollen (s. Tab. 4.2 und 4.3)).

Thymus		PBL
TMG 04	entfällt	entfällt
TMG 16	-	entfällt
TMG 20	2/3,2	entfällt
TMG 21	entfällt	entfällt
TMG 22	entfällt	entfällt
TMG 25	1/4,0	entfällt
TMG 27	13.6/2,0	entfällt
TMG 28	7/4,5 17/4,2 20/2,3 21.3/2,3	entfällt
TMG 30	entfällt	entfällt
TMG 31	-	entfällt
TMG 32	entfällt	entfällt
TMG 34	1/3,3 11/6,0 13.1/2,0	entfällt
TMG 35	-	entfällt
TMG 36	-	entfällt
TMG 37	entfällt	entfällt
TMG 38	13.1/2,9	entfällt
TMG 39	entfällt	entfällt
TMG 41	-	entfällt
TMG 44	2/3,3 5.1/6,7	entfällt
TMG 55	entfällt	entfällt
TMG 58	5.1/4,9 13.1/3,0 22/3,0	entfällt
TMG 61	2/3,1	entfällt
TMG 62	-	entfällt

Vβ-Expansionen von CD4⁺/CD8⁺-Zellen der immunsuppressiv behandelten MG-Pat. (Vβ-Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert bei Normalkontrollen (s. Tab. 4.2 und 4.3)).

Thymus		PBL
TMG 01	-	1/2,3 5.1/4,6 12/3,0 23/9,2
TMG 02	-	14/2,4
TMG 03	11/3,0 17/4,5	-
TMG 08	-	-
TMG 13	-	5.2/3,3 5.3/13,2 7/11,7 11/4,0 16/6,0 23/2,6
TMG 14	-	1/2,7 5.2/4,1 5.3/7,8 13.1/2,5 16/3,2 21.3/2,6
TMG 18	-	5.1/2,6 5.3/7,2 13.1/2,9
TMG 24	-	5.1/5,0 5.3/3,3 13.1/9,9
TMG 26	-	5.3/10,4
TMG 29	-	5.1/2,6 5.3/10,2
TMG 40	7/5,3 12/2,8 13.1/2,4	5.1/4,6 8/2,5 13.1/3,5
TMG 42	5.1/2,6 7/3,2 13.1/2,4	3/4,8 5.3/5,5 11/5,8 12/3,1
TMG 43	13.1/2,2	-
TMG 45	-	14/2,0
TMG 51	21.3/2,4	13.1/2,2
TMG 54	12/2,4	16/2,1
TMG 60	3/2,0 5.3/2,6 14/5,5 18/4,0 21.3/2,7	14/2,2

Vβ-Expansionen von CD4⁺-Zellen der unbehandelten MG-Pat. (Vβ-Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert bei Normalkontrollen (s. Tab. 4.2 und 4.3)).

Thymus		PBL
TMG 01	-	13.1/2,9 18/2,8
TMG 02	-	14/2,4
TMG 03	-	5.1/2,2
TMG 08	-	7/2,8 17/2,4
TMG 13	-	1/16,6 5.2/9,5 5.3/4,5 7/3,8 9/2,6 11/2,0
TMG 14	-	5.3/2,7 14/2,2
TMG 18	-	5.2/2,8 5.3/2,4
TMG 24	-	5.1/5,1 5.2/6,3
TMG 26	-	1/2,0 5.1/2,0 5.2/2,5 5.3/3,6 16/7,0
TMG 29	-	5.1/4,1 5.2/2,7
TMG 40	7/5,1 13.1/2,4	5.1/3,8 5.2/4,1 5.3/2,6 8/2,7
TMG 42	7/2,6 13.1/2,2	5.3/3,2
TMG 43	-	16/4,3
TMG 45	-	-
TMG 51	5.2/2,3 20/2,2	-
TMG 54	-	-
TMG 60	-	-

V β -Expansionen von CD8⁺-Zellen der unbehandelten MG-Pat. (V β -Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert bei Normalkontrollen (s. Tab. 4.2 und 4.3)).

Thymus		PBL
TMG 01	-	entfällt
TMG 02	1/2,7	entfällt
TMG 03	-	entfällt
TMG 08	-	entfällt
TMG 13	2/3,5	entfällt
TMG 14	1/3,2 2/3,0	entfällt
TMG 18	-	entfällt
TMG 24	-	entfällt
TMG 26	-	entfällt
TMG 29	-	entfällt
TMG 40	13.1/2,2	entfällt
TMG 42	5.1/2,2	entfällt
TMG 43	1/2,4	entfällt
TMG 45	1/6,5 2/6,4	entfällt
TMG 51	-	entfällt
TMG 54	-	entfällt
TMG 60	14/2,4	entfällt

Vβ-Expansionen von CD4⁺/CD8⁺-Zellen der unbehandelten MG-Pat. (Vβ-Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert bei Normalkontrollen (s. Tabb. 4.2 und 4.3)).

Thymus		PBL
Tn 63	3/2,5	entfällt
Tn 64	11/3,2 22/3,1	1/2,8 12/3,5
Tn 67	1/3,6 2/2,6 14/2,4 21.3/2,6	1/2,5 16/7,9 23/2,0
Tn 68	-	-
Tn 69	entfällt	-
Tn 71	-	-
Tn 72	-	-
Tn 73	entfällt	-
Tn 74	-	entfällt
Tn 75	7/3,4	14/3,4
Tn 76	-	-
Tn 77	-	-
Tn 78	-	14/7,3
Tn 79	23/2,8	-
Tn 80	entfällt	-
Tn 81	5.2/2,5 5.3/3,0	-
Tn 82	8/2,0	-
Tn 83	20/2,2	11/2,3 16/2,1
Tn 85	entfällt	-
Tn 86	-	-
Tn 87	entfällt	5.3/2,6

Vβ-Expansionen von CD4⁺-Zellen der Normalkontrollen. (Vβ-Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert (s. Tab. 4.2 und 4.3)).

Thymus		PBL
Tn 63	3/3,1 12/3,1 21.3/2,6	entfällt
Tn 64	13.6/2,9 16/2,6 18/3,3 22/3,6	5.3/5,6 22/2,0
Tn 67	5.1/3,0 9/3,2 11/2,9 16/2,1	13.1/4,6 16/4,0
Tn 68	-	3/3,6 21.3/2,4
Tn 69	entfällt	17/2,0
Tn 71	-	14/6,1
Tn 72	-	5.2/2,2
Tn 73	entfällt	-
Tn 74	17/3,4	entfällt
Tn 75	2/2,9	-
Tn 76	7/2,3 13.1/2,1	-
Tn 77	5.3/2,0	2/4,5
Tn 78	-	13.6/2,2
Tn 79	23/2,8	-
Tn 80	entfällt	5.1/5,7
Tn 81	5.3/2,5	14/2,8
Tn 82	-	3/7,3 5.3/2,5 11/2,9 17/3,2
Tn 83	-	18/4,0
Tn 85	entfällt	13.1/5,1
Tn 86	-	16/2,9
Tn 87	entfällt	18/9,7

V β -Expansionen von CD8⁺-Zellen der Normalkontrollen. (V β -Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert (s. Tab. 4.2 und 4.3)).

Thymus		PBL
Tn 63	3/3,5 5.2/2,0 21.3/2,0	entfällt
Tn 64	-	entfällt
Tn 67	16/2,6	entfällt
Tn 68	5.3/2,1	entfällt
Tn 69	entfällt	entfällt
Tn 71	-	entfällt
Tn 72	-	entfällt
Tn 73	entfällt	entfällt
Tn 74	22/2,5	entfällt
Tn 75	14/2,3	entfällt
Tn 76	7/2,8 12/2,9 20/3,1	entfällt
Tn 77	-	entfällt
Tn 78	9/2,0	entfällt
Tn 79	-	entfällt
Tn 80	entfällt	entfällt
Tn 81	-	entfällt
Tn 82	11/2,3 18/2,4	entfällt
Tn 83	13.6/2,3	entfällt
Tn 85	entfällt	entfällt
Tn 86	-	entfällt
Tn 87	entfällt	entfällt

Vβ-Expansionen von CD4⁺/CD8⁺-Zellen der Normalkontrollen (Vβ-Kette/Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert (s. Tabb. 4.2 und 4.3)).